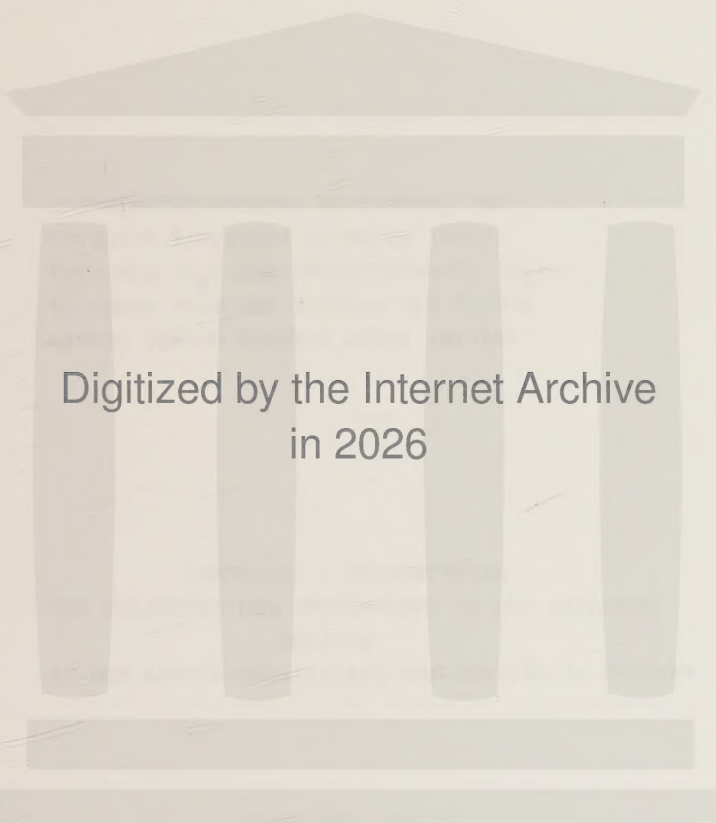


ENZYMIMMUNOLOGISCHE BESTIMMUNG
VON THYROXIN BINDENDEM
GLOBULIN (TBG), THYROXIN (T_4) UND
TRIJODTHYRONIN (T_3) IM SERUM
NACH DER TECHNIK DES ENZYME
LINKED IMMUNO SORBENT ASSAY (ELISA)

Martina Röhler

Diss
München
1984



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554007_0103

AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK INNENSTADT
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DIREKTOR: PROFESSOR DR. E. BUCHBORN

ENZYMIMMUNOLOGISCHE BESTIMMUNG VON
THYROXIN BINDENDEM GLOBULIN (TBG),
THYROXIN (T_4) UND TRIJODTHYRONIN (T_3)
IM SERUM NACH DER TECHNIK DES ENZYME
LINKED IMMUNO SORBENT ASSAY (ELISA)

INAUGURAL - DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE IN DER GESAMTEN
MEDIZIN
AN DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

vorgelegt von
Martina Röhler
aus Bad Nauheim

1984

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Prof.Dr.med. K. Horn
Mitberichterstatter: Prof.Dr.med. E. Buchborn
Dekan: Prof.Dr.med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 19.07.1984

Meiner Mutter
und dem Andenken meines Vaters
in Dankbarkeit gewidmet

Mein Dank gilt

Herrn Prof. Dr. med. K. HORN

für die stetige Hilfe und Förderung, die mir
in zahlreichen, anregenden Diskussionen bei
dieser Arbeit zuteil wurden,

Frau Dr. med. Cornelia BERNUTZ

für ihre unermüdliche Unterstützung und die
ausgezeichnete Betreuung,

Herrn J. Henner für die Anregungen im technischen
Bereich,

Frau F. Haag für ihre Hilfe bei der Anfertigung
der Abbildungen,

sowie Frau Th. Kubiczek, Frä. P. Rank und allen
anderen Assistentinnen für die angenehme Zusammen-
arbeit.

INHALTSVERZEICHNIS
=====

	Seite
1. <u>EINLEITUNG</u> =====	1
2. <u>METHODIK</u> =====	3
2.1. <u>Material</u>	3
2.1.1. Gele	3
2.1.2. Reagenzien	3
2.1.3. Geräte	4
2.1.4. Spezielle Serumpräparationen und Antiseren	5
2.1.4.1. Thyroxin bindendes Globulin (TBG)	5
2.1.4.2. Gewinnung des TBG-"Nullserum"	5
2.1.4.3. Schilddrüsenhormon freie "Nullseren"	5
2.1.4.4. Gewinnung der TBG-Antiseren	6
2.1.4.5. Gewinnung der T ₃ - und T ₄ - Antiseren	6
2.1.4.6. 2. Antikörper	7
2.2. <u>Methoden</u>	8
2.2.1. Radioimmunologische Referenz- methoden der Routinediagnostik	8
2.2.1.1. Inkubationsansatz für den TBG-RIA	8
2.2.1.2. Thyroxin-RIA	9
2.2.1.2.1. Inkubationsansatz für den Thyroxin-RIA	10
2.2.1.3. Trijodthyronin-RIA	11
2.2.1.3.1. Inkubationsansatz für den Trijodthyronin-RIA	12
2.2.2. Entwicklung von Enzymimmuno- assays für die Bestimmung von TBG, T ₄ und T ₃ nach dem ELISA- Prinzip	13
2.2.2.1. Prinzip	13
2.2.2.2. Methodik	15
2.2.2.2.1. Vorreinigung der Antiseren	15
2.2.2.2.2. Adsorption der Antikörper an Küvetten	15

2.2.2.2.3.	Austesten der optimalen Antikörperkonzentration zum Beschichten	15
2.2.2.2.4.	Durchführung des ELISA in den Antikörper beschichteten Küvetten	16
2.2.2.2.5.	Gerätebeschreibung des Mikro-ELISA Geräts der Firma Gilford	16
2.2.2.2.6.	Auswertung der Eichkurven	17
2.2.2.3.	Praktische Durchführung der Enzymimmunoassays	18
2.2.2.3.1.	TBG-ELISA	18
2.2.2.3.2.	T ₄ -ELISA	19
2.2.2.3.3.	T ₃ -ELISA	20
3.	METHODISCHE VORVERSUCHE =====	22
3.1.	<u>Präparation der Antikörper zum Beschichten</u>	22
3.1.1.	Affinitätschromatographie über Protein A-Sepharose	23
3.1.1.1.	Prinzip der Protein A-Sepharose	23
3.1.1.2.	Präparation der Säule	23
3.1.1.3.	Auftrennung des Antiserums über Protein A-Sepharose	23
3.1.2.	Entsalzen der IgG-Präparation auf Sephadex G-25 medium	25
3.1.2.1.	Prinzip der Sephadex G-25 Säule	25
3.1.2.2.	Praktische Durchführung	25
3.2.	<u>Kopplung von POD an TBG</u>	26
3.2.1.	Prinzip der einzelnen Kopplungsschritte am Beispiel der Kopplung des TBG an den aktivierten Zuckeranteil der POD	27
3.2.1.1.	Prinzip der Blockierung der Aminogruppen der POD	27
3.2.1.2.	Prinzip der Oxydation des Zuckeranteils der Peroxidase	28
3.2.1.3.	Inaktivierung überschüssigen Natriumperjodats	29

	Seite
3.2.1.4.	Prinzip der Abtrennung der POD von Natriumperjodat, Fluordinitrobenzol und Äthylenglycol 30
3.2.1.5.	Kopplung von TBG an den aktivierten Zuckeranteil der POD 31
3.2.1.6.	Prinzip der Stabilisierung der Schiff'schen Base 32
3.2.1.7.	Einengen 33
3.2.1.7.1.	Prinzip der Kollodiumhülse 33
3.2.2.	Austestung eines optimalen Trennverfahrens des TBG-POD Konjugates von den nicht gekoppelten Proteinen 35
3.2.2.1.	Sephacryl S-200 Superfine-Säule 35
3.2.2.1.1.	Prinzip dieser Säule 35
3.2.2.1.2.	Präparation der Säule 35
3.2.2.1.3.	Chromatographische Trennung 35
3.2.2.2.	AcA-44-Säule 36
3.2.2.2.1.	Prinzip dieser Säule 36
3.2.3.	Nachweis des TBG-POD Konjugates bzw. des ungekoppelten TBG und der POD 38
3.2.3.1.	Ermittlung des TBG-Gehaltes in den einzelnen Fraktionen 38
3.2.3.2.	Ermittlung des POD-Gehaltes in den einzelnen Fraktionen 38
3.2.3.3.	Ermittlung des TBG-POD Konjugates in den einzelnen Fraktionen 38
3.2.4.	Praktische Durchführung der Kopplung des TBG an den aktivierten Zuckeranteil der POD 39
3.2.4.1.	Ergebnis der TBG-POD Kopplung 40
3.2.5.	Praktische Durchführung der Kopplung der POD an den aktivierten Zuckeranteil der POD 42
3.2.5.1.	Kopplung 43
3.2.5.2.	Ergebnisse zu diesem Kopplungsverfahren 45
3.2.6.	Kopplung des aktivierten Zuckeranteils der POD an den aktivierten Zuckeranteil des TBG über einen Lysin-Spacer 46
3.2.6.1.	Schematische Darstellung des Versuchsansatzes 48

	Seite
3.2.6.2.	Ergebnisse zu diesem Kopp- lungsverfahren 49
3.3.	<u>Wirkungsprinzip des spezifischen Substratpuffers für die Peroxi- dase aus Meerrettich</u> 51
4.	ERGEBNISSE ===== 53
4.1.	<u>Vergleich der verschiedenen Ver- fahren der TBG-POD Kopplung</u> 53
4.2.	<u>Ergebnisse zum TBG-Enzymimmuno- assay</u> 55
4.2.1.	TBG-Antikörperkonzentration zum Beschichten der Küvetten 55
4.2.2.	Kalibrierstandardkurve für das TBG 55
4.2.3.	Qualitätskontrolle des TBG-Enzym- immunoassays 57
4.2.3.1.	Präzision 57
4.2.3.2.	Vergleich der Meßwerte von RIA und EIA 57
4.3.	<u>Ergebnisse zum T₄-Enzymimmuno- assay</u> 59
4.3.1.	T ₄ -Antikörperkonzentration zum Beschichten der Küvetten 59
4.3.2.	Kalibrierstandardkurve des T ₄ 59
4.3.3.	Qualitätskontrolle des T ₄ -En- zymimmunoassays 61
4.3.3.1.	Präzision 61
4.3.3.2.	Vergleich der Meßwerte von RIA und EIA 61
4.3.3.3.	TBG-Unabhängigkeit 63
4.3.3.4.	"Wiederfindung" von T ₄ -Standards 65
4.4.	<u>Ergebnisse zum T₃-Enzymimmunoassay</u> 65
4.4.1.	T ₃ -Antikörperkonzentration zum Beschichten der Küvetten 65
4.4.2.	Kalibrierstandardkurve des T ₃ 65
4.4.3.	Qualitätskontrolle des T ₃ -Enzym- immunoassays 67
4.4.3.1.	Präzision 67
4.4.3.2.	Vergleich der Meßwerte von RIA und EIA 67

		Seite
4.4.3.3.	TBG-Unabhängigkeit	69
4.4.3.4.	"Wiederfindung" von T ₃ -Standards	70
5.	DISKUSSION =====	71
6.	ZUSAMMENFASSUNG =====	77
7.	LITERATURVERZEICHNIS =====	79

1. EINLEITUNG
=====

Die Entwicklung des Radioimmunoassays (RIA) durch Yalow und Berson (41) vor mehr als 20 Jahren trug wesentlich zum Fortschritt in der endokrinologischen Forschung bei.

Durch die hohe Sensitivität und Spezifität, durch die sich der RIA auszeichnete, wurde eine direkte Bestimmung von Hormonen in Körperflüssigkeiten möglich.

Die wesentlichen Nachteile des RIA liegen jedoch im Umgang mit Radioaktivität, der u.a. spezielle Räumlichkeiten und regelmäßige Kontrolluntersuchungen des Personals erfordert.

Deshalb wurden in den letzten Jahren Methoden entwickelt, die, basierend auf dem Prinzip des RIA, die Verwendung von Isotopen zu umgehen versuchen. An erster Stelle sei hierfür der Enzymimmunoassay (EIA) erwähnt, bei dem das radioaktiv markierte Antigen durch ein enzymmarkiertes ersetzt wird. Die Proben werden nicht mehr im Gammazählgerät, sondern die Enzymaktivität im Photometer gemessen.

Im wesentlichen unterscheidet man zwei Arten von Enzymimmunoassays, den homogenen und den heterogenen. Der homogene EIA, bekannt als EMIT (enzyme multiplied immunoassay technique) findet heute gerade zum Nachweis von Arzneimitteln und Drogen weite Anwendung. Beim EMIT befinden sich alle Reaktionspartner in Lösung, denn die Bindung eines spezifischen Antikörpers an das entsprechende enzymmarkierte Antigen führt zu einer Änderung der Enzymaktivität. Diese äußert sich entweder in einer Hemmung oder einer Aktivierung. Beim heterogenen EIA nach der ELISA-Technik (enzyme linked immuno sorbent assay) ist der Antikörper an eine feste Phase immobilisiert, die Enzymaktivität wird durch die spezifische Antikörper-

bindung nicht geändert, wodurch vor der Messung der Enzymaktivität ein Trennungsschritt erforderlich wird.

Als Vorteil gegenüber dem EMIT sei erwähnt, daß die ELISA-Technik für Moleküle jeder Größenordnung anwendbar ist und sich durch eine höhere Sensitivität auszeichnet.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die in der Schilddrüsenbasisdiagnostik verwendeten radioimmunologischen Bestimmungsmethoden für T_4 (Thyroxin), TBG (Thyroxin bindendes Globulin) und T_3 (Trijodthyronin) durch enzymimmunologische Verfahren abzulösen.

Sie wurden einheitlich nach dem Prinzip der ELISA-Technik aufgebaut.

2. METHODIK =====

2.1. Material

2.1.1. Gele

Folgende Gele wurden von der Firma Pharmacia,
Uppsala, Schweden, bezogen:

- Protein A-Sepharose CL-4B zur Affinitätschromatographie von Immunglobulinen
- Con A-Sepharose
- Sephadex G-25 medium zur Auftrennung nach Molekulargewicht im Bereich zwischen 1000 und 5000 D.
- Sephacryl S-200 Superfine zur Auftrennung nach Molekulargewicht im Bereich zwischen 5000 und 250 000 D.

Von der Firma LKB, Bromma, Schweden, wurde das Ultragel AcA-44, mit einem Auftrennungsbereich zwischen 10 000 und 130 000 D bezogen.

2.1.2. Reagenzien

- Peroxidase aus Meerrettisch Typ VI RZ 3.0, Fa. Sigma, Chemical Company, St.Louis, Mo. USA
- 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol, Fa. Merck, Darmstadt, wurde mit Äthanol absolut auf 1 g/100 ml verdünnt.

Äthylenglycol, Natriumborhydrid, Natrium-meta-Periodat, Natriumperborat, Glycin und Thymol, alle von der Fa. Merck, Darmstadt. Zur Herstellung einer thymolgesättigten Lösung wurde das in festem Zustand befindliche Thymol in dem jeweiligen Puffer gelöst; eventuell verbliebene Reste wurden über einen Filter entfernt.

Zur Kopplung verwendete T_3 - und T_4 -Succinimide stammten, ebenso wie ABTS [2,2'-Azino-di-(3-ethyl-benz-thiazolinsulfonsäure (6))] von der Fa. Boehringer, Mannheim.

- L-Thyroxin (T_4) und L-Trijodthyronin (T_3) für Standards, Fa. Henning, Berlin
- ^{125}J -TBG-Tracer wurde nach der Chloramin-T-Methode (16) markiert und in 2g/l Rinderalbumin in 0,05 mol/l Natriumphosphatpuffer pH 7,4 verdünnt.
- ^{125}J - T_4 -Tracer von der Fa. Behringwerke AG Marburg wurde in 0,1 mol/l HCl + 200 g/l Propylen-glycol verdünnt.
- ^{125}J - T_3 -Tracer von der Fa. Radiochemical Centre, Amersham, England, wurde in 0,1 mol/l HCl + 200 g/l Propylenglycol verdünnt.
- Rinderalbumin, Fa. Roth, Karlsruhe
- Substratpuffer zur Messung der Enzymaktivität der Peroxidase:
Grundlösung: 0,1 mol/l Natriumacetat, dem zur Stabilisierung des Reagenzienleerwertes 0,05 mol/l NaH_2PO_4 zugesetzt wurde (pH 4,6).
spezifisches Substrat: 5 mmol/l Natriumperborat
Farbindikator: 0,2 mol/l ABTS

2.1.3. Geräte

- Digital Dilutor, Fa. Hamilton, Bonaduz, Schweiz
- Chromatographie-Einheit (bestehend aus: Kühlt-schrank, 4°C, Pumpe, UV-Monitor, Fraktionssamm-ler und Schreiber), Fa. LKB, Bromma, Schweden
- Einengvorrichtung mit Kollodiumhülsen SM 13 200, Fa. Sartorius-Membranfilter GmbH, Göttingen
- automatischer Mikro Elisa Analysator, Modell EIA-PR 50, und Küvetten-Racks mit Einmalküvetten, Fa. Gilford Instruments, Düsseldorf
- 16-Kanal-Gamma-Zähler, NE 1600, Fa. Nuclear Enter-prises

2.1.4. Spezielle Serumpräparationen und Antiseren

2.1.4.1. Thyroxin bindendes Globulin (TBG)

TBG wurde nach der in unserem Labor entwickelten Methode gewonnen (11, 17): TBG wurde mit einer Affinitätschromatographie über die Epoxy-Sepharose 6 B, an die T_3 kovalent gekoppelt war, aus menschlichem Serum isoliert. Nach mehreren, extensiven Waschschritten durch Puffer mit verschiedenen pH-Werten und Ionenstärken wurde TBG mit T_4 spezifisch desorbiert. Dazu wurden 10 mg T_4 in 100 ml 0,1 mol/l Tris-HCl Puffer pH 8,6 gelöst, dem als Lösungsvermittler 1 g/l Humanalbumin zugegeben wurde. Von diesem Albumin wurde TBG in einer letzten Affinitätschromatographie über Con A-Sepharose abgetrennt.

2.1.4.2. Gewinnung des TBG-"Nullserums"

TBG-freies "Nullserum" wurde durch Chromatographie von Humanserum über eine Säule mit T_3 -Epoxy-Sepahrose 6 B (s. o. 2.1.4.1.) gewonnen, auf der TBG quantitativ aus dem Serum extrahiert wurde.

2.1.4.3. Schilddrüsenhormon freie "Nullseren"

Diese Seren stammten von Patienten mit Struma maligna, bei denen eine totale Thyreoidektomie, eventuell zusätzlich eine Radiojodtherapie und externe Nachbestrahlung durchgeführt worden war. Zur Durchführung eines diagnostischen ^{131}Jod -Speicherungstests einschließlich Ganzkörperszintigraphie, zum Ausschluß eines Tumorrezidivs oder einer Metastasierung, war bei diesen Patienten die laufende T_3 -Behandlung für 10 Tage abgesetzt worden. Diese T_3 - und T_4 -freien "Nullseren" wurden gepoolt

und zum Ansetzen der T_3 - und T_4 -Standardkurven, sowie für Verdünnungskurven individueller Patientenserum, verwendet.

2.1.4.4. Gewinnung der TBG-Antiseren

Die TBG-Antiseren standen uns nach der in unserem Labor entwickelten Methode (17) zur Verfügung. Mit TBG in komplettem Freud'schen Adjuvans wurden Kaninchen intracutan multilokulär immunisiert. Nach 3 Boosterungen im Abstand von 3 Wochen hatten die Kaninchen ausreichende TBG-Antikörper erreicht. Für den RIA wurde dieses Antiserum 1:300 in 2 g/l Rinderalbumin, in 0,05 mol/l Natriumphosphatpuffer pH 7,4, verdünnt.

2.1.4.5. Gewinnung der T_3 - und T_4 -Antiseren

Die T_3 - und T_4 -Antiseren waren mit der in unserem Labor von R. Gärtner (11) entwickelten Methode gewonnen worden:

Zunächst wurde T_3 oder T_4 jeweils mit wasserlöslichem Carbodiimid kovalent an Rinderthyreoglobulin gekoppelt. Mit diesem Konjugat wurden Kaninchen immunisiert. Bei einigen Kaninchen konnten Antiseren gewonnen werden, die ihr Bindungsoptimum in extremen pH-Bereichen hatten, in denen das endogene TBG T_3 und T_4 nicht mehr bindet.

So zeigten einige T_4 -Antiseren im sauren pH-Bereich zwischen pH 3,8 und pH 5,5 bzw. T_3 -Antiseren zwischen pH 9 und pH 10 ihre Bindungsoptima.

Für den RIA wurden die T_4 -Antiseren 1:150, die T_3 -Antiseren 1:17 500 in 0,15 mol/l NaCl verdünnt.

2.1.4.6. 2. Antikörper

Das von der Ziege stammende Anti-Kaninchen-Gammaglobulin (2. Antikörper) wurde von der Fa. Paesel bezogen und für den TBG-RIA 1:50 in NaCl verdünnt. Die Bindungsoptima der Antiseren wurden ausgetestet; es ergaben sich folgende Verdünnungen:

Für den T_4 -RIA wurde ein Inkubationsgemisch aus T_4 -Antiserum in einer Verdünnung von 1:150 und 2. Antikörper in einer Verdünnung von 1:40 verwendet, für den T_3 -RIA ein Inkubationsgemisch aus T_3 -Antiserum in einer Verdünnung von 1:17 500 und 2. Antikörper in einer Verdünnung von 1:37,5.

Die Antikörper wurden in 0,15 mol/l NaCl verdünnt.

2.2. Methoden

2.2.1. Radioimmunologische Referenzmethoden der Routinediagnostik

2.2.1.1. Inkubationsansatz für den TBG-RIA

- 10 µl TBG-Kalibrierstandard bzw. Serumprobe
- + 100 µl ^{125}J -TBG-Tracer
- + 100 µl Antikörperlösung (1:300)
- 2 Std. bei Zimmertemperatur inkubieren
- + 100 µl Anti-Kaninchen-Gammaglobulin (1:50)
- + 1 ml 50 g/l Polyäthylenglycol (PEG)*in 0,05 mol/l Natriumphosphatpuffer pH 7,4
- 15 min bei 4000 Umdrehungen/min zentrifugieren
- Überstand absaugen
- mit 1ml 0,15 mol/l NaCl waschen
- 15 min bei 4000 Umdrehungen/min zentrifugieren
- Überstand absaugen
- Messen des Antikörper-gebundenen Anteils des radioaktiv markierten TBG im Gammazählgerät

* Durch die Zugabe von PEG wird die Komplexbildung zwischen TBG-Antiserum und Anti-Kaninchen-Gammaglobulin beschleunigt.

Die Verdünnung des TBG-Standards erfolgt in TBG-"Nullserum". Standardverdünnungsreihe: 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4 und 8 mg/dl TBG.

2.2.1.2. Thyroxin-RIA

Dieser T_4 -RIA wurde nach der in unserem Labor nach der von R. Gärtner entwickelten Methode durchgeführt (11).

Sie beruht auf einer optimalen Bindung des T_4 -Antikörpers im sauren pH-Bereich, bei dem die spezifischen Bindungsproteine, wie z.B. TBG, ihre Bindungsfähigkeit zum T_4 im Serum verlieren und deshalb im Assay nicht mehr stören.

Mit Hilfe dieses Prinzips kann man auf verdrängende Substanzen, wie z.B. ANS (8-Anilin-1-Naphtalin-Sulfonsäure), die die Bindung des Thyroxins zum TBG blockiert, verzichten.

Die Serumproben wurden mit 0,1 mol/l HCl denaturiert. Da der Antikörper sein Bindungsoptimum bei pH 3,8 hat, wurde mit 0,1 mol/l Dinatriumcitrat auf diesen pH umgepuffert.

T_4 - Antiserum und Anti-Kaninchen-Gammaglobulin mußten im neutralen pH präpräzipitiert hinzugegeben werden, da die beiden Antikörper nur bei einem pH von 7,4 optimal aneinander binden, nicht aber in dem sauren Milieu des Inkubationsansatzes von pH 3,8.

2.2.1.2.1. Inkubationsansatz für den Thyroxin-RIA

- 10 μ l T₄-Standard bzw. Serumprobe
- + 120 μ l ¹²⁵J-T₄-Tracer
- + 100 μ l 0,1 mol/l Dinatriumcitrat
- + 100 μ l Inkubationsgemisch, bestehend aus T₄-Antiserum (1:150) und Anti-Kaninchen-Gammaglobulin (1:40)
- 1 Std. bei Zimmertemperatur inkubieren
- + 800 μ l 0,15 mol/l NaCl
- 15 min bei 4000 Umdrehungen/min zentrifugieren
- Überstand absaugen
- mit 1ml 0,15 mol/l NaCl waschen
- 15 min bei 4000 Umdrehungen/min zentrifugieren
- Überstand absaugen
- Messen des Antikörper-gebundenen Anteils des radioaktiv markierten Thyroxins im Gammazählgerät.

Dit T₄-Standards wurden in T₄-"Nullserum" verdünnt.
Standardverdünnungsreihe: 0, 1,5, 3, 6, 12, 24, 48 μ g/dl.

2.2.1.3. Trijodthyronin-RIA

Dieser T_3 -RIA wurde ebenfalls nach der in unserem Labor (11) entwickelten Methode durchgeführt. Sie beruht auf dem Prinzip der optimalen Bindung des T_3 -Antikörpers bei pH-Werten zwischen 9 und 10. In diesem pH-Bereich stören spezifische Bindungsproteine nach vorheriger alkalischer Denaturierung mit NaOH nicht im Assay.

Aufgrund dieses Prinzips erübrigt sich der stör anfällige Zusatz von Substanzen, wie z.B. ANS, die die Bindung des Trijodthyronins zum TBG blockieren. Die Serumproben wurden mit 0,15 mol/l NaOH denaturiert. Zum Umpuffern auf pH 9,2 wurde eine 0,63 mol/l Glycinlösung verwendet. Auch bei diesem Assay mußten die beiden Antikörper präpräzipitiert hinzugegeben werden, da eine optimale Bindung von T_3 -Antiserum und Anti-Kaninchen-Gammaglobulin aneinander nur bei pH 7,4 erfolgt.

2.2.1.3.1. Inkubationsansatz für den Trijodthyronin-RIA

- 25 µl T₃-Standard bzw. Serumprobe
- + 200 µl 0,15 mol/l NaOH
- + 100 µl 0,63 mol/l Glycinlösung
- + 100 µl ¹²⁵J-T₃-Tracer
- + 100 µl Inkubationsgemisch, bestehend aus T₃-Antiserum (1:17 500) und Anti-Kaninchen-Gammaglobulin (1:37,5)
- über Nacht bei Zimmertemperatur inkubieren
- + 1 ml 0,15 mol/l NaCl
- 15 min bei 4000 Umdrehungen/min zentrifugieren
- Überstand absaugen
- mit 1 ml 0,15 mol/l NaCl waschen
- 15 min bei 4000 Umdrehungen/min zentrifugieren
- Überstand absaugen
- Messen des Antikörper-gebundenen Anteils des radioaktiv markierten Trijodthyronins im Gammazählgerät.

Die T₃-Kalibrierstandards wurden in T₃-"Nullserum" verdünnt. Standardverdünnungsreihe: 0, 25, 50, 100, 400 und 800 ng/dl.

2.2.2. Entwicklung von Enzymimmunoassays für die Bestimmung von TBG, T_4 und T_3 nach dem ELISA-Prinzip

2.2.2.1. Prinzip

Das Prinzip des ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay) ist in Abb.1 schematisch aufgezeigt.

Bei der ELISA-Technik werden Polysterol-Küvetten mit einem spezifischen Antiserum gegen die zu bestimmende Substanz beschichtet, wobei die Antikörper an die Wand adsorbiert werden. Anschließend werden Serumproben mit einem Konjugat aus Enzym und Antigen inkubiert; das endogene Hormon und der Enzym-Antigen-Komplex konkurrieren um die Antikörperbindungsstellen an der Wand. Nach einer bestimmten Inkubationszeit erfolgt die Trennung von Antikörper-gebundenem und freiem Antigen durch Absaugen und Waschen der Küvetten.

Abhängig von der endogenen Konzentration der nachzuweisenden Substanz werden unterschiedliche Mengen des Enzym-markierten Antigens am wandadsorbierten Antikörper spezifisch gebunden. Der Nachweis erfolgt durch Messung der Enzymaktivität. Dazu gibt man einen für das Enzym spezifischen Substratpuffer zu, dessen Farbreaktionen dann die Enzymaktivität im Photometer meßbar macht.

Je höher die Konzentration der zu messenden Substanz in der Probe ist, destoweniger Antigen-Enzym-Konjugat wird vom Antikörper gebunden; eine entsprechend geringere Extinktionsänderung wird im Photometer gemessen.

1. TRENNUNG VON T4 VON TRÄGERPROTEINEN UND KOMPETITIVE BINDUNG AN DEN ANTIKÖRPER



Wand Antikörper freies Hapten T4-Peroxidase-Konjugat

2. TRENNEN VON FREIEM UND GEBUNDENEM HAPTEN-ENZYM



3. INDIKATORREAKTION: SUBSTRATUMSATZ, PHOTOMETRIE

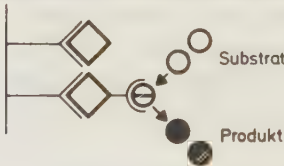


Abb.1 Schematische Darstellung des ELISA-Prinzips

2.2.2.2. Methodik

2.2.2.2.1. Vorreinigung der Antiseren

Vor dem Beschichten der Küvetten wurden die Immunglobuline aus den Antiseren über Protein A-Sepharose isoliert und anschließend über eine Sephadex G-25 medium Säule in 0,04 mol/l Natriumphosphatpuffer pH 7,4 gebracht (s. method. Vorversuche 3.1. bis 3.1.2.2.).

2.2.2.2.2. Adsorption der Antikörper an Küvetten

In Polysterol-Einmalküvetten (Fa. Gilford), die in Einheiten von 50 Stück auf einem Schlitten angeordnet sind, wurden jeweils 500 µl einer vorgereinigten Antikörperlösung gegen TBG, T₃ oder T₄ pipettiert. Nach Inkubation über Nacht wurden die Küvetten abgesaugt und zweimal mit kaltem Leitungswasser gewaschen. Zu Absättigung von freien Bindungsstellen an den Polysterolküvetten wurden diese mit je 500 µl einer 3 g/l Rinderalbuminlösung in 0,05 mol/l Natriumphosphatpuffer pH 7,4 nachbeladen. Nach 30 min. wurde die Lösung wieder abgesaugt und die Küvetten einmal mit kaltem Leitungswasser gewaschen. Danach konnten die Küvetten sofort verwendet werden oder sie wurden trocken bei 4°C gelagert.

2.2.2.2.3. Austesten der optimalen Antikörperkonzentration zum Beschichten

Die optimale Antikörperverdünnung für die Beschichtung der Küvetten wurde für die verschiedenen Enzymimmunoassays einmal empirisch ermittelt. Hierzu wurden Küvetten mit Antiseren in verschiedenen Verdünnungen beschichtet. Für den endgültigen ELISA wurde die Antikörperkonzentration gewählt, mit der die steilste Eichkurve im diagnostisch interessanten Bereich erzielt wurde.

2.2.2.2.4. Durchführung des ELISA in den Antikörper beschichteten Küvetten

In den mit den Antikörpern beschichteten Küvetten wurden die Kalibrierstandards von TBG, T₃ oder T₄ bzw. Serumproben mit den entsprechenden Antigen-Enzymkonjugaten inkubiert. Danach wurden die Küvetten abgesaugt und 5 mal mit kaltem Leitungswasser gewaschen. Anschließend wurden 500 µl Substratpuffer (s. 2.1.2) in jede Küvette pipettiert.

Nach ausreichender Inkubationszeit, die für TBG, T₃ und T₄ unterschiedlich lang war, wurde die Enzymaktivität und damit die Menge des Antikörper-gebundenen Antigen-Enzymkomplexes anhand der Farbentwicklung bei 405 nm im Photometer gemessen.

Da das Antigen-Enzymkonjugat sich nicht in Lösung befand, sondern am wandadsorbierten Antikörper gebunden war, war die Farbentwicklung innerhalb der Küvette nicht homogen. Deshalb mußten die Proben unmittelbar vor der Messung durch Zugabe von weiteren 100 µl Substratpuffer durchmischt werden.

2.2.2.2.5. Gerätebeschreibung des Mikro-ELISA Geräts der Firma Gilford

50 Küvetten sind zu je 5 Bändern mit je 10 Küvetten en bloc auf einem kleinen Schlitten angeordnet. Die einzelnen Küvettenstreifen lassen sich über Schienen aus dem Schlitten herausziehen. Über diese Schienen werden die Küvettenstreifen in das Gerät gezogen, wo über einen Dispenser die entsprechenden Lösungen in die einzelnen Küvetten pipettiert werden. Durch ein im Inneren des Geräts befindliches Schlauchsystem mit 10 zuführenden und 10 wegführenden Schläuchen können immer 10 Küvetten gleichzeitig über eine

Vakuumpumpe abgesaugt und anschließend - mittels eines mit Wasser gefüllten Gefäßes zum Füllen des Schlauchsystems - gewaschen werden. In dem im Gerät integrierten Photometer werden die Proben nacheinander gemessen und die Extinktionen über einen angeschlossenen Drucker ausgegeben. Die Anzahl der Waschschrirte ist variabel und am Gerät einzustellen. Mit dem Mikro-ELISA-PR 50 der Fa. Gilford wurde automatisch beschichtet, nachbeladen und - in einem jeweils am Gerät einzustellenden Zeittakt - gewaschen, abgesaugt und gemessen.

2.2.2.2.6. Auswertung der Eichkurven

Die Extinktionen der Standardeichkurven und der Serumproben wurden off-line über Lochstreifen in die EDV-Anlage Siemens 404/3 eingegeben und nach dem Prinzip der Spline-Approximation berechnet (21).

2.2.2.3. Praktische Durchführung der Enzymimmuno- assays

2.2.2.3.1. TBG-ELISA

Die praktische Durchführung des TBG-ELISA ist in Tab.1 schematisch dargestellt. Die Küvetten wurden mit 500 µl TBG-Antikörper in einer Verdünnung von 1:4000 beschichtet (s. 4.2.1.). Danach wurden 10 µl Standard bzw. Serum und 400 µl des TBG-POD Konjugates (= 10-15 ng TBG, s. 3.2.4.1.) in einer Verdünnung von 1:50 000 mit dem Dilutor in jede Küvette pipettiert. Der Verdünnungspuffer für das Konjugat war ein 0,05 mol/l Natriumphosphatpuffer pH 7,4, in den zusätzlich 3 g/l Rinderalbumin, 0,02 mol/l EDTA und 0,15 mol/l Kochsalz eingewogen waren. Serum und TBG-POD Konjugat wurden 2 Std. in den mit TBG-Antikörper beschichteten Küvetten inkubiert. Danach wurde das Inkubationsgemisch - und damit das nicht vom Antikörper gebundene TBG-Enzymkonjugat - abgesaugt und 5 mal mit kaltem Leitungswasser gewaschen. Über einen Dispenser wurden 500 µl Substratpuffer dazugegeben. Nach einer Reaktionszeit von ca. 20 min wurden nochmals 100 µl Substratpuffer zum Durchmischen der Proben hinzupipettiert und dann die Extinktionen bei 405 nm im Photometer gemessen.

2.2.2.3.2. T₄-ELISA

Die praktische Durchführung des T₄-ELISA ist in Tab.1 schematisch dargestellt.

Die Küvetten wurden mit 500 µl T₄-Antikörper in einer Verdünnung von 1:6000 beschichtet (s. 4.3.1).

Analog zum T₄-RIA (11) beruht auch der T₄-EIA auf der optimalen Bindung des T₄-Antikörpers im sauren pH-Bereich.

10 µl Standard bzw. Serum werden in die Küvette gegeben. Durch Zugabe von 100 µl 0,1 mol/l HCl werden die Serumproteine denaturiert, während der wandadsorbierte Antikörper seine Bindungseigenschaften nicht verliert. Beim EIA konnte nicht analog zum RIA anschließend auf pH 3,8 umgepuffert werden, da die POD bei diesem pH ihre Aktivität verliert. Deshalb wurde auf pH 5,0 mit 200 µl einer Mischung aus 1 Teil 0,2 mol/l NaOH und 3 Teilen 0,1 mol/l Acetatpuffer pH 5,0 umgepuffert. Auch bei diesem pH stören die Serumproteine den Assay nicht.

Anschließend wurden 50 µl T₄-POD in einer Verdünnung von 1:5000 in 0,05 mol/l Natriumphosphatpuffer pH 7,4 zu jeder Probe hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 Std. wurde das nicht vom Antikörper gebundene T₄-Enzymkonjugat abgesaugt und die Küvetten 5 mal mit kaltem Leitungswasser gewaschen. In die abgesaugten Küvetten wurden über einen Dispenser 500 µl Substratpuffer pipettiert. Nach einer Reaktionszeit von 15-20 min wurden nochmals 100 µl Substratpuffer zum Durchmischen der Proben dazugegeben und dann die Extinktionen bei 405 nm im Photometer gemessen.

2.2.2.3.3. T₃-ELISA

Die praktische Durchführung des T₃-ELISA ist in Tab.1 schematisch dargestellt.

Die Küvetten wurden mit 50 µl T₃-Antikörper in einer Verdünnung von 1:20 000 beschichtet (s. 4.4.1). 25 µl Serumprobe bzw. Kalibrierstandard wurde mit 200 µl 0,15 mol/l NaOH in jede Küvette gegeben.

Analog zu dem in unserem Labor entwickelten T₃-RIA (11) beruht auch der T₃-EIA auf der optimalen Bindung des T₃-Antikörpers bei pH-Werten zwischen 9 und 10 nach alkalischer Denaturierung der Serumproteine. Der an die Wand der Küvetten adsorbierte Antikörper wurde durch Zugabe der 0,15 mol/l NaOH nicht in seinen Bindungseigenschaften beeinträchtigt. Mit 100 µl 1,05 mol/l Glycin wurde auf pH 9,2 umgepuffert. In diesem pH-Bereich wurde die beste Bindung des Antikörpers (11) erzielt, die POD erwies sich gerade im Alkalischen als besonders stabil.

Anschließend wurden 50 µl T₃-POD in einer Verdünnung von 1:10 000 in 0,05 mol/l Natriumphosphatpuffer pH 7,4 zu jeder Probe hinzugegeben. Die Proben wurden über Nacht inkubiert. Danach wurde das nicht vom Antikörper gebundene Enzymkonjugat abgesaugt und die Küvetten 5 mal mit kaltem Leitungswasser gewaschen. In die wiederum abgesaugten Küvetten wurden über einen Dispenser 500 µl Substratpuffer pipettiert. Nach einer Reaktionszeit von 40-50 min wurden nochmals 100 µl Substratpuffer zum Durchmischen der Proben hinzugegeben und dann die Extinktionen bei 405 nm im Photometer gemessen.

Tab.1 Schematische Darstellung der praktischen Durchführung des ELISA für TBG, T₄ und T₃

	Antikörper verd. z. Beschichten d. Küvetten	Serumprobe oder Standard	Inkubationsansatz
TBG	1:4000	10 µl	400µl TBG-POD-Konjugat, 1:5000 2 Std. inkubieren Absaugen, Waschen 20 min mit Substratpuffer inkubieren bei 405nm Enzymaktivität messen
T ₄	1:6000	10 µl	200µl Mischung aus: 1 Teil 0,2mol/l NaOH* u. 3 Teilen 0,1mol/l Acetat-Phosphat-Puffer pH 5,0** u. 50µl T ₄ -POD, 1:5000 2 Std. inkubieren Absaugen, Waschen 20 min mit Substratpuffer inkubieren bei 405nm Enzymaktivität messen
T ₃	1:20 000	25 µl	200µl 0,15mol/l NaOH* 100µl 1,05mol/l Glycin** u. 50µl T ₃ -POD, 1:10 000 über Nacht inkubieren Absaugen, Waschen 50 min mit Substratpuffer inkubieren bei 405nm Enzymaktivität messen

* zum Denaturieren

** zum Umpuffern

3. METHODISCHE VORVERSUCHE
=====

3.1. Präparation der Antikörper zum Beschichten
der Küvetten

Wie im Prinzip des ELISA (2.2.2.1.) beschrieben, muß der spezifische Antikörper in optimaler Konzentration wandadsorbiert werden. Da die Proteinbindungskapazität der Polyesterolküvetten begrenzt ist, muß der Antikörper vor dem Beschichten der Küvetten vorgereinigt werden. Als einfach durchzuführende Methode bot sich die Affinitätschromatographie für Gammaglobuline über eine Protein A-Sepharose-Säule an, bei der das Antiserum von Albuminen, α - und Beta-Globulinen befreit wird. Über eine Sephadex G-25 medium-Säule wurden die Gammaglobuline in den auch zum Beschichten der Küvetten verwendeten, 0,04 mol/l Natriumphosphatpuffer pH 7,4, gebracht.

3.1.1. Affinitätschromatographie über Protein A-Sepharose

3.1.1.1. Prinzip der Protein A-Sepharose

Protein A, das aus der Zellwand von *Staphylococcus aureus* isoliert wird, bindet spezifisch das Fc-Fragment von Gammaglobulinen verschiedener Spezies, während Albumine, α - und Beta-Globuline nicht gebunden werden. Für die Affinitätschromatographie wird Protein A kovalent an Sepharose CL-4 B gekoppelt.

3.1.1.2. Präparation der Säule

0,8 g Protein A-Sepharose wurden in einem Überschuß 0,05 mol/l Natriumphosphatpuffer pH 7,4 etwa 15 min. gequollen und unter Vermeidung von Luftblasen in eine kleine Säule - Zylinder einer 2 ml-Einmalspritze mit einem Filterpapier als Fritte vor dem Auslauf - gepackt. Nach vollständiger Sedimentation wurde die Säule mit 3 Säulenvolumina des 0,05 mol/l Natriumphosphatpuffers pH 7,4 äquilibriert.

3.1.1.3. Auftrennung des Antiserums über Protein A-Sepharose

Auf das mit 0,05 mol/l Natriumphosphatpuffer pH 7,4 äquilibrierte Protein A-Säulchen wurde 1 ml Antiserum (T_3 -, T_4 - oder TBG-Antiserum) aufgetragen; die Gammaglobuline blieben zunächst an das Gel gebunden. Albumine, α - und Beta-Globuline wurden eluiert. Es wurde so lange mit 0,05 mol/l Natriumphosphatpuffer pH 7,4 nachgespült, bis kein Protein mehr im Eluat nachweisbar war.

Erst durch Zugabe von 0,1 mol/l Glycin-HCl-Puffer pH 3,0 wurden dann die Gammaglobuline eluiert. Um ein Denaturieren des Proteins in dem sauren Milieu zu vermeiden,

wurde in jedes Röhrchen 1 ml 0,2 mol/l Di-Kaliumhydrogenphosphat zum Umpuffern vorgelegt. Die Gammaglobulin-enthaltenden Fraktionen des Eluats wurden gepoolt (Abb.2).

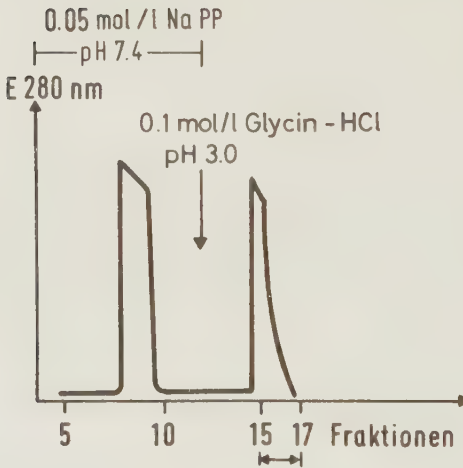


Abb.2 Elutionsprofil bei Chromatographie der Antiseren
über ein Protein A-Sepharose-Säulchen

Ordinate: Extinktion bei 280 nm

Abszisse: Anzahl der Fraktionen à 4 ml

1. Peak: Albumin, α - und Beta-Globuline

2. Peak: Gammaglobuline

Pfeil: gepoolte Fraktionen

3.1.2. Entsalzen der IgG-Präparation auf Sephadex G-25 medium

3.1.2.1. Prinzip der Sephadex G-25 Säule

Die Auftrennung erfolgt hierbei über ein Molekularsieb mit einer Ausschlußgrenze zwischen 1000 und 5000D. So dringen z.B. Salze und andere niedermolekulare Stoffe in das innere Volumen der Gelperlen ein und werden dadurch verzögert eluiert, wogegen die höher molekularen Proteine im Ausschlußvolumen der Säule wandern und rascher eluiert werden.

3.1.2.2. Praktische Durchführung

Sephadex G-25 medium wurde über Nacht in aqua bidest. gequollen und anschließend unter Vermeidung von Luftblasen in eine 60 cm lange Säule mit einem Innendurchmesser von 2 cm gefüllt. Nach vollständiger Sedimentation wurde die Säule mit 3 Säulenvolumina des 0,04 mol/l Natriumphosphatpuffers pH 7,4 vorgespült.

Die durch den Glycin-HCl-Puffer pH 3,0 von der Protein A-Säule eluierten und mit 0,2 mol/l K_2HPO_4 umgepufferten IgG-Fraktionen wurden gepoolt und auf die Sephadex G-25 medium-Säule aufgetragen. Auf diese Weise wurden die Gammaglobuline in den 0,04 mol/l Natriumphosphatpuffer pH 7,4, mit dem die G-25-Säule äquilibriert worden war, gebracht und von Salzen, wie z.B. Glycin, befreit.

Der so vorgereinigte Antikörper wurde in einer jeweils entsprechenden Verdünnung zum Beschichten der Küvetten verwendet.

3.2. Kopplung von POD an TBG

In den folgenden Versuchen wurden drei verschiedene Modifikationen zur Herstellung von TBG-POD-Konjugaten nach dem von Nakane (25) publizierten Prinzip der Kopplung von NH_2 -Gruppen eines Proteins an den durch Perjodsäure aktivierten Zuckeranteil eines anderen Proteins ausgetestet:

- Aktivierung des Zuckeranteils der Peroxidase und Kopplung der Aminogruppen des TBG unter Bildung einer Schiff'schen Base
- Kopplung der Aminogruppen der POD an den aktivierten Zuckeranteil des TBG
- Kopplung von TBG an POD über einen Lysinspacer. Hierzu wurden Lysinmoleküle in den aktivierten Zuckeranteil des TBG eingebaut und anschließend eine Schiff'sche Base zwischen dem aktivierten Zuckeranteil der POD und den NH_2 -Gruppen des Lysins gebildet.

3.2.1. Prinzip der einzelnen Kopplungsschritte
am Beispiel der Kopplung des TBG an den
aktivierten Zuckeranteil der POD

3.2.1.1. Prinzip der Blockierung der Aminogruppen
der POD

Um eine Vernetzung der POD-Moleküle während der späteren Oxydation mit Natriumperjodat zu verhindern, werden die Aminogruppen der Peroxidase durch Zugabe von 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol (FDNB) blockiert. Es handelt sich hierbei um eine nukleophile Substitution (Abb.3).

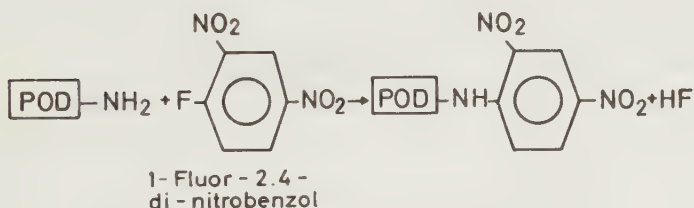


Abb.3 Blockierung der NH₂-Gruppen der Peroxidase
durch 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol

3.2.1.2. Prinzip der Oxydation des Zuckeranteils
der Peroxidase

Der Zuckeranteil der POD, die ein Molekulargewicht von 40 000 D hat, beträgt 15-20%. Dieser Zuckeranteil wird durch Zugabe von Natriumperjodat zum Aldehyd oxidiert (Abb.4).

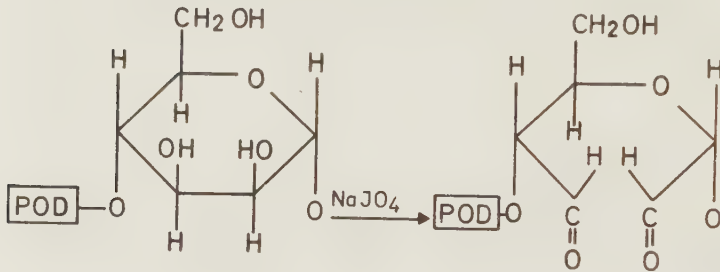


Abb.4 Aktivierung des Zuckeranteils der POD durch
Natriumperjodat

3.2.1.3. Inaktivierung überschüssigen Natriumperjodats

Die zur Aktivierung des Zuckeranteils der POD nicht benötigte, überschüssige Perjodsäure wird durch Zugabe von Äthylenglycol inaktiviert. Es resultiert ein Dialdehyd. Aus Perjodat entsteht Jodat (Abb.5).

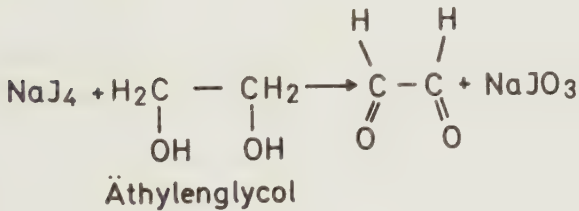


Abb.5 Inaktivierung des überschüssigen Natriumperjodats durch Äthylenglycol

3.2.1.4. Prinzip der Abtrennung der POD von Natriumperjodat, Fluordinitrobenzol und Äthylen-glycol

Die aktivierte Peroxidase wird auf eine Sephadex G-25 medium-Säule aufgetragen, die mit dem Puffer äquilibriert ist, in dem die spätere Kopplung stattfindet. Natriumperjodat, Fluordinitrobenzol und Äthylen-glycol werden von der Säule verzögert eluiert (Abb.6).

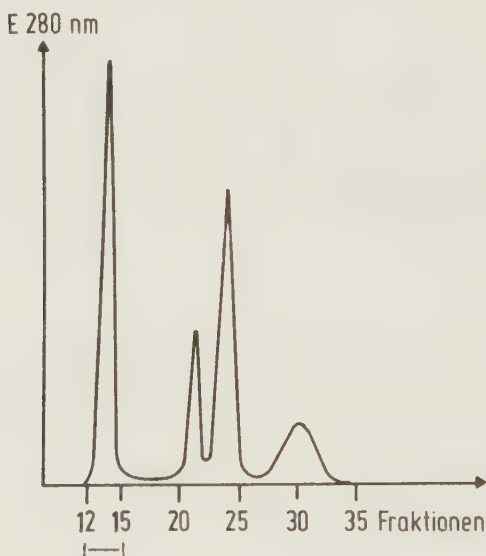


Abb.6 Elutionsprofil von der Sephadex G-25 medium-Säule

Abszisse: Anzahl der Fraktionen Δ 4 ml

Ordinate: Extinktion bei 280 nm

Pfeil: gepoolte Fraktionen

3.2.1.5. Kopplung von TBG an den aktivierten Zucker- anteil der POD

Zu den gepoolten, POD-enthaltenden Fraktionen wird TBG gegeben; die Aminogruppen des TBG werden an den aktivierten Zuckeranteil der POD gekoppelt. Es entsteht eine Schiff'sche Base (Abb.7).

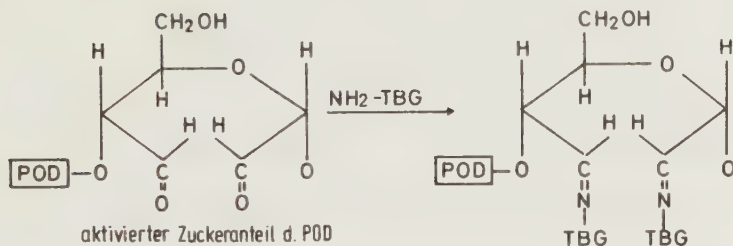


Abb.7 Kopplung der Aminogruppen des TBG an den
aktivierten Zuckeranteil der POD

3.2.1.6. Prinzip der Stabilisierung der Schiff'schen Base

Durch Zugabe von Natriumborhydrid wird die (s. 3.2.1.5.) entstandene Schiff'sche Base reduziert und damit stabilisiert (Abb.8).

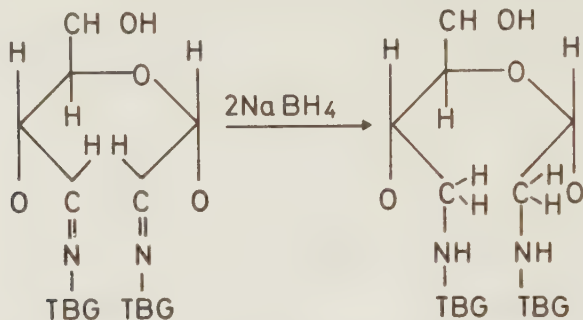


Abb.8 Reduktion der Schiff'schen Base durch Natriumborhydrid

3.2.1.7. Einengen

3.2.1.7.1. Prinzip der Kollodiumhülse

Die Kollodiumhülse ist eine semipermeable Membran, ihre Ausschlußgrenze liegt bei einem Molekulargewicht von 12 400 D. Proteine bleiben innerhalb der Kollodiumhülse, die nur für kleine Moleküle, wie z.B. Salze, durchlässig ist.

Die auf einem Glastrichter befindliche Kollodiumhülse wird in eine, durch einen Gummiring luftdicht verschlossene, mit aqua bidest. gefüllte Saugflasche gesteckt. Nach Einfüllen der Proteinlösung in die Kollodiumhülse wird die Saugflasche an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen und damit ein Unterdruck hergestellt. Überschüssiges Wasser und Salze gelangen durch die semipermeable Membran nach außen, wogegen Proteine innerhalb der Kollodiumhülse bleiben.

3.2.2. Austestung eines optimalen Trennverfahrens
des TBG-POD Konjugates von den nicht gekop-
pelten Proteinen

3.2.2.1. Sephacryl S-200 Superfine-Säule

3.2.2.1.1. Prinzip dieser Säule

Sephacryl S-200 Superfine ist ein Dextrangel, das nach Molekulargewicht trennt. Der Auftrennungsbe-
reich liegt bei einem Molekulargewicht zwischen 5000
und 250 000 D.

3.2.2.1.2. Präparation dieser Säule

Das über 24 Std. in thymolgesättigtem, 0,05 mol/l
NaCl in 0,1 mol/l Tris-HCl Puffer pH 8,0 gequollene
Gel wurde entgast, unter Vermeidung von Luftblasen
in eine 1,20 m lange Säule mit einem Innendurchmesser
von 1 cm gepackt und die vollständige Sedimentation
abgewartet. Anschließend wurde die Säule mit 3 Säu-
lenvolumina des obigen Puffers äquilibriert.

3.2.2.1.3. Chromatographische Trennung

Die in einer Kollodiumhülle eingeeingte Proteinlösung
wurde - ohne die Geloberfläche zu verletzen - auf
die Säule pipettiert; anschließend wurde mit dem unter
3.2.2.1.2 beschriebenen Tris-HCl Puffer nachgespült.
Diese Säule brachte bei einer Laufzeit von etwa 5 Std.
keine ausreichende Auftrennung der Fraktionen (Abb.9).

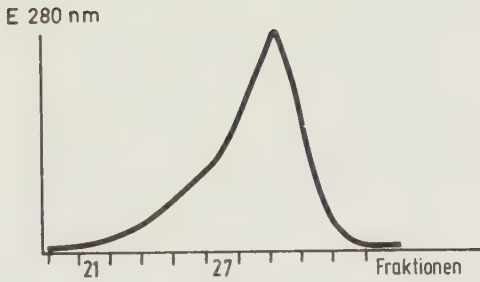


Abb.9 Elutionsprofil von der Sephacryl S-200
Superfine-Säule

Abszisse: Anzahl der Fraktionen à 4 ml

Ordinate: Extinktion bei 280 nm

3.2.2.2. AcA-44-Säule

3.2.2.2.1. Prinzip dieser Säule

AcA-44 ist ein Polyacrylamid Agarose Gel, dessen Auftrennungsoptimum bei Molekulargewichten zwischen 10 000 und 130 000 D liegt.

3.2.2.2.2. Präparation der Säule

Das bereits fertig gequollene Gel wurde entgast und mittels einer Pumpe unter ständigem Rühren mit einem Rührstab und unter Vermeidung von Luftblasen langsam von oben in eine 1,60 m lange Säule mit einem Innendurchmesser von 1 cm gepumpt. Nach vollständiger Sedimentation des Gels wurde die Säule über 24 Std. mit einem thymolgesättigten, 0,05 mol/l Natriumphosphatpuffer pH 7,4, dem 0,1 mol/l Kochsalz zugesetzt war, äquilibriert.

3.2.2.2.3. Chromatographische Trennung

Das Proteingemisch wurde nach der POD-TBG Kopplungsreaktion auf die Säule pipettiert. Nach Einsinken der Lösung wurde mit thymolgesättigtem, 0,05 mol/l Natriumphosphatpuffer pH 7,4, dem 0,1 mol/l Kochsalz zugesetzt war, nachgespült.

Die optische Dichte der Proteinlösung wurde in der Durchlaufküvette eines angeschlossenen Photometers gemessen und mittels eines Schreibers aufgezeichnet. Die Säule hatte eine Laufzeit von ca. 7 Std. Die Eluate wurden von einem Fraktionssammler aufgefangen (Abb.10).

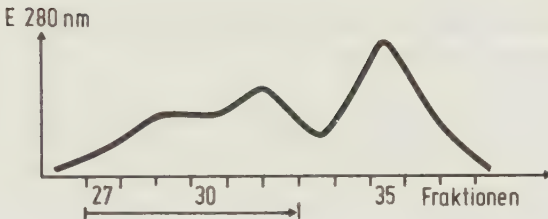


Abb.10 Elutionsprofil von der AcA-44-Säule

Abszisse: Anzahl der Fraktionen $\cdot$ 4 ml

Ordinate: Extinktion bei 280 nm

1. Peak: POD-TBG Konjugat
2. Peak: nicht oder mit wenig POD gekoppeltes TBG
3. Peak: freie POD

Wie schon aus dem Elutionsprofil ersichtlich wird, wurde über die AcA-44-Säule (s. Abb.10) eine wesentlich bessere Trennung des POD-TBG Konjugates von POD und TBG erzielt, als über die Sephacryl S-200 Superfine-Säule (s. Abb.9).

Im Idealfall erwartet man drei Peaks:

- Das TBG-POD Konjugat mit einem Molekulargewicht von etwa 100 000 D oder höher,
- das möglicherweise ungekoppelte TBG mit einem Molekulargewicht von etwa 55 000 D und
- die überschüssige POD, mit einem Molekulargewicht von etwa 40 000 D.

3.2.3. Nachweis des TBG-POD Konjugates bzw.
des ungekoppelten TBG und der POD

3.2.3.1. Ermittlung des TBG-Gehaltes in den ein-
zelnen Fraktionen

Der TBG-Gehalt der einzelnen Fraktionen wurde mit Hilfe des Radioimmunoassays ermittelt (2.2.1.1.).

3.2.3.2. Ermittlung des POD-Gehaltes in den ein-
zelnen Fraktionen

Um den POD-Gehalt der Fraktionen zu ermitteln, wurden jeweils 10 µl der einzelnen Fraktionen in die Küvette eines Eppendorf-Photometers pipettiert und 500 µl Substratpuffer hinzugegeben. Nach 1 min wurde die Enzymaktivität bei 405 nm gemessen.

3.2.3.3. Ermittlung des TBG-POD Konjugates in den
einzelnen Fraktionen

Das nächste Ziel war, herauszufinden, in welchen Fraktionen mit Enzymaktivität sich das TBG-POD Konjugat befand. Jede Fraktion, in der TBG nachgewiesen worden war, wurde so verdünnt, daß sich in 10 µl noch 50 ng TBG befanden. In mit TBG-Antikörper beschichteten Küvetten wurden 10 µl jeder Fraktion und 300 µl 3 g/l Rinderalbumin in 0,05 mol/l Natriumphosphatpuffer pH 7,4 pipettiert. Nach einer 2-stündigen Inkubationszeit wurden die Küvetten abgesaugt und 5 mal mit kaltem Leitungswasser gewaschen. Anschließend wurden 500 µl Substratpuffer hinzugegeben. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 15 min wurde die Enzymaktivität im Eppendorf-Photometer bei 405 nm gemessen.

3.2.4. Praktische Durchführung der Kopplung des
TBG an den aktivierten Zuckeranteil der POD

Nachdem 5 mg POD in 1 ml 0,3 mol/l Bicarbonat gelöst waren, wurden als erstes die Aminogruppen der POD durch Zugabe von 100 µl 10 g/l Fluordinitrobenzol blockiert. Das Gefäß mit der Lösung wurde zum Mischen für 1 Stunde auf einem Schüttler befestigt. Anschließend wurde zur Aktivierung des Zuckeranteils der POD zum Aldehyd 1 ml 0,08 mol/l Natriumperjodat hinzugegeben und die Lösung für eine halbe Stunde auf einen Schüttler gestellt.

Zum Inaktivieren der überschüssigen Perjodsäure wurden dann 100 µl 1,6 mol/l Äthylenglycol hinzugegeben. Anschließend wurde das Gefäß für eine weitere Stunde auf dem Schüttler befestigt.

Danach wurde die Mischung auf die Geloherfläche einer Sephadex G-25 medium-Säule pipettiert. Die Eluate wurden zu je 4 ml pro Röhrchen im Fraktionssammler aufgefangen. Die optische Dichte wurde in der Durchlaufküvette eines Photometers gemessen. Die POD enthaltenen Fraktionen wurden gepoolt und mit 1,5 mg TBG versetzt. Dieses Gemisch wurde bei 4°C über Nacht inkubiert. Zur Reduktion der Schiff'schen Base wurden am nächsten Tag 5mg Natriumborhydrid zur Mischung gegeben.

Das TBG-POD Konjugat, das in einem Volumen von 8 ml vorlag, wurde in eine - wie unter 3.2.1.7.1. beschrieben - präparierte Kollodiumhülse pipettiert. Um eine salzfreie Proteinlösung zu erhalten, wurde das aqua bidest. während des Einengvorganges dreimal gewechselt. Nach einer Volumenreduktion innerhalb der Kollodiumhülse auf ca. 500 µl wurde die Wasserstrahlpumpe abgeschaltet. Eine Stunde lang ließ man das aqua bidest. aus der Saugflasche in die kollodiumhülse zurückdiffundieren, um an die Membran adsorbierte Proteine wieder in Lösung zu bringen. Erst dann wurde die eingeengte Mischung aus der Kollodiumhülse herauspipettiert und - wie unter 3.2.2.2.3. beschrieben - auf eine AcA-44-Säule pipettiert.

3.2.4.1. Ergebnis der TBG-POD Kopplung

Das POD-TBG Konjugat befindet sich im 1. Peak des Elutionsprofils, da hier - umgerechnet auf den TBG-Gehalt - die höchste Bindung an mit Antikörper beschichteten Tubes (s. Abb.11) zu finden war. Die Verdünnung der POD enthaltenden Fraktionen wurde so berechnet, daß in jeder Probe gleich viel TBG enthalten war.

Im 2. Peak fand sich ungekoppeltes TBG oder TBG, an das nur wenig POD gebunden wurde. Wieviel ungekoppelte TBG sich in diesen Fraktionen befand, war nicht genau festzustellen, da auch hier eine Bindung des TBG-POD-Konjugates nachgewiesen werden konnte. Um einen entsprechenden Substratumsatz zu erzielen, mußte hier jedoch wesentlich mehr TBG eingesetzt werden (s. Abb.11).

Im 3. Peak des Elutionsprofils der AcA-44-Säule fand sich die überschüssige POD, da im TBG-RIA in diesen Fraktionen kein TBG nachgewiesen wurde und keine Bindung an die mit Antikörper beschichteten Tubes stattfand, obwohl in diesen Fraktionen eine hohe Aktivität der Peroxidase ermittelt werden konnte (s. Abb.11).

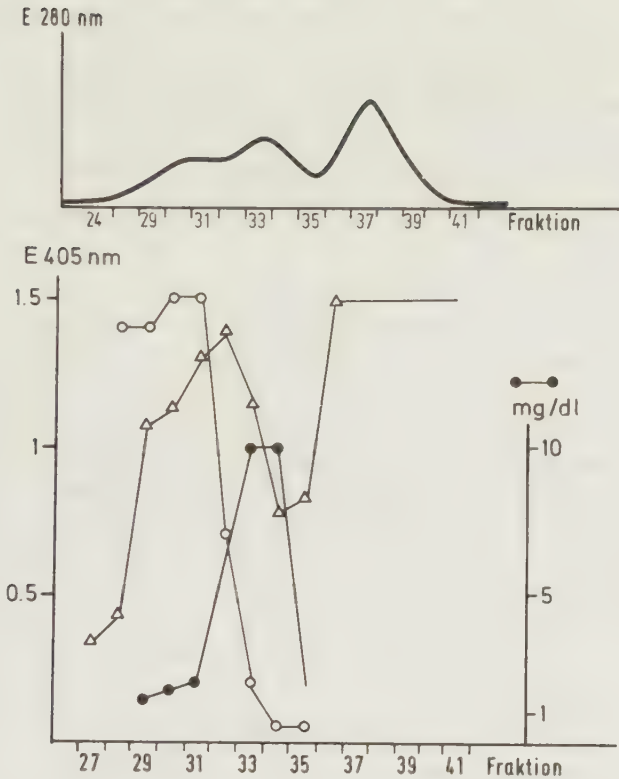


Abb. 11

oben:

Elutionsprofil von der AcA-44-Säule

im RIA ermittelter TBG-Gehalt der einzelnen
Fraktionen

Abszisse: Anzahl der Fraktionen à 4ml

Ordinate: mg/dl TBG

▲ — ▲ — ▲

POD-Aktivität in den einzelnen Fraktionen

○ — ○ — ○

TBG-POD-Konjugat wurde durch einen Bindungs-
test an mit Antikörper beschichteten Tubes
ermittelt

Abszisse: Anzahl der Fraktionen à 4ml

Ordinate: Extinktion bei 280nm

3.2.5. Praktische Durchführung der Kopplung der
POD an den aktivierten Zuckeranteil des TBG

Das TBG hat ein Molekulargewicht von ca. 55 000 D, mit einem Zuckeranteil von etwa 15%. Dieser Zuckeranteil wird, entsprechend der Methode von Nakane (24), mit Natriumperjodat aktiviert. Daran werden die Aminogruppen der Peroxidase gekoppelt (Abb. 12).

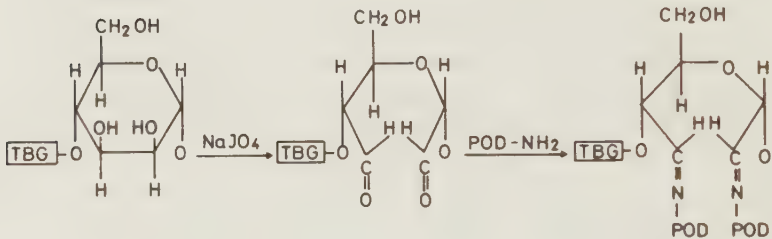


Abb.12 Aktivierung des Zuckeranteils des TBG mit Natriumperjodat und Kopplung an die Aminogruppen der Peroxidase

3.2.5.1. Kopplung

1 mg TBG wurde in 100 μ l 0,3 mol/l Bicarbonat gelöst. Die freien NH_2 -Gruppen des TBG wurden durch Zugabe von 20 μ l 10 g/l Fluordinitrobenzol blockiert. Zum Durchmischen wurde das Gefäß mit der Inkubationslösung für eine Stunde auf einem Schüttelgerät befestigt. Danach wurde der Zuckeranteil des TBG mit 20 μ l 0,08 mol/l Natriumperjodat zum Aldehyd oxidiert und die Mischung für 30 min auf einen Schüttler gestellt. Zur Inaktivierung der überschüssigen Perjodsäure wurde die Lösung mit 200 μ l 0,16 mol/l Äthylenglycol versetzt und anschließend für eine Stunde auf dem Schüttler durchmischt.

Das TBG wurde über eine Sephadex G-25 medium-Säule, die mit 0,01 mol/l Bicarbonatpuffer pH 9,5 äquilibriert worden war, entsalzt. Die TBG enthaltenden Fraktionen, die in einem Volumen von insgesamt etwa 8 ml von der Säule kamen, wurden gepoolt, mit 5 mg POD versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. In dieser Zeit koppelten die Amino-
gruppen der Peroxidase an die Aldehydgruppen des aktivierten Zuckeranteils des TBG.

Zur Stabilisierung der Schiff'schen Base wurde am nächsten Tag 1 mg Natriumborhydrid zu der Lösung gegeben.

Nach einer Inkubationszeit von 3 Stunden wurde die Mischung in einer Kollodiumhülse auf ca. 500 μ l eingengt. Die eingeengte Lösung wurde auf eine Aca-44-Säule, die über Nacht mit einem thymolgesättigten, 0,05 mol/l Natriumphosphatpuffer pH 7,4 und 0,1 mol/l NaCl äquilibriert worden war, aufgetragen.

3.2.5.2. Ergebnisse zu diesem Kopplungsverfahren

Das TBG-POD Konjugat ließ sich von Fraktion 28-31 nachweisen; umgerechnet auf den TBG-Gehalt wurde hier die höchste Bindung an mit Antikörper beschichteten Tubes erzielt, was anhand von Abb. 13 erkenntlich wird. Die POD enthaltenden Fraktionen wurden so verdünnt, daß jede Probe gleich viel TBG enthielt. Freies oder mit wenig POD gekoppeltes TBG wurde von Fraktion 32 bis 35 nachgewiesen. Es ließ sich wiederum nicht genau feststellen, wieviel ungekoppeltes TBG sich in diesen Fraktionen befand; eine Bindung des TBG-POD Konjugates konnte noch erreicht werden. Allerdings mußte man wesentlich höhere TBG-Konzentrationen einsetzen, um einen entsprechenden Substratumsatz zu erzielen (Abb. 13). Die überschüssige Peroxidase befand sich in den Fraktionen 36-41 des Elutionsprofils von der AcA-44-Säule. Wie aus Abb. 13 ersichtlich wird, konnte hier im TBG-RIA fast kein TBG mehr nachgewiesen werden. An die mit Antikörper beschichteten Tubes konnte keine Bindung erreicht werden, obwohl in diesen Fraktionen eine hohe POD-Aktivität festgestellt werden konnte (s. Abb. 13).

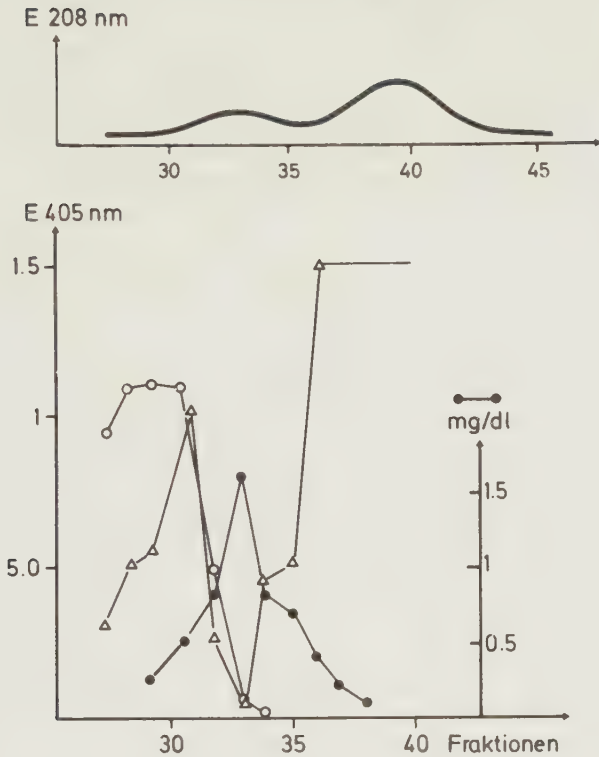


Abb. 13

●—●—●

im RIA ermittelter TBG-Gehalt der einzelnen Fraktionen

Abszisse: Anzahl der Fraktionen à 4ml

Ordinate: mg/dl TBG

△—△—△

POD-Aktivität in den einzelnen Fraktionen

○—○—○

TBG-POD-Konjugat wurde durch einen Bindungs-
test an mit Antikörper beschichteten Tubes
ermittelt

Abszisse: Anzahl der Fraktionen à 4ml

Ordinate: Extinktion bei 280nm

3.2.6. Kopplung des aktivierten Zuckeranteils der POD
an den aktivierten Zuckeranteil des TBG über
einen Lysin-Spacer

An den aktivierten Zuckeranteil des TBG wird Lysin gekoppelt, wodurch zusätzlich freie Aminogruppen eingeführt wurden. Über diesen Spacer von 6 CH_2 -Gruppen wird der aktivierte Zuckeranteil der POD an das TBG gekoppelt.

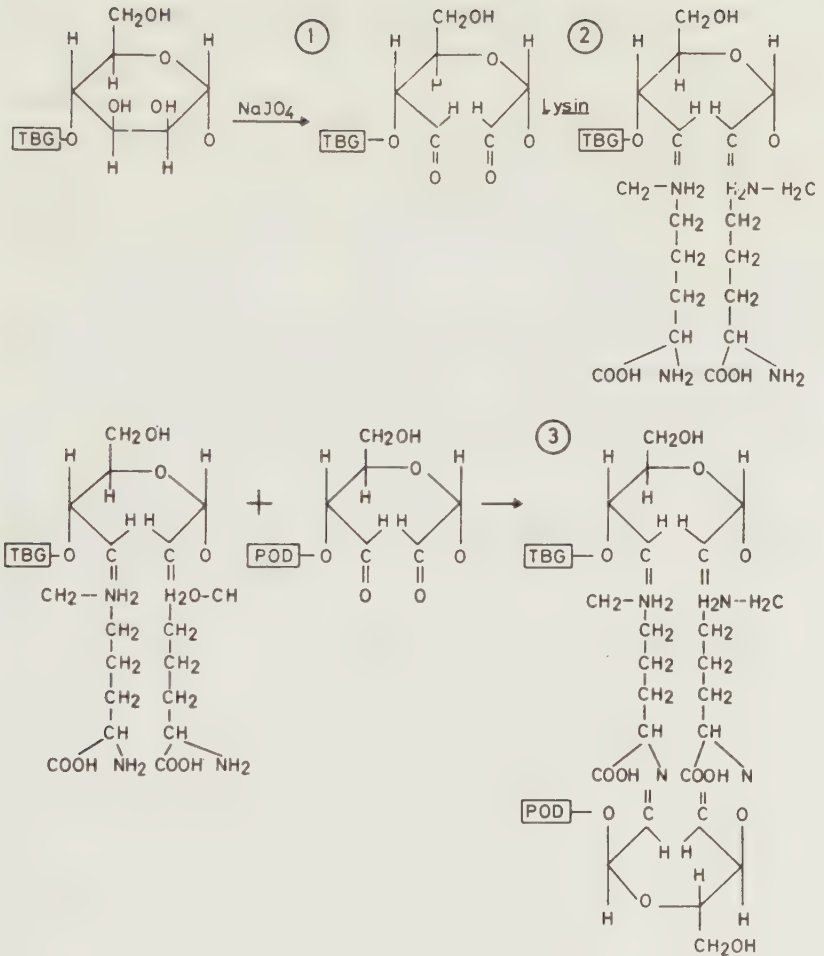


Abb.14 1. Aktivierung des Zuckeranteils des TBG mit Natriumperjodat
 2. Einführung der Aminosäure Lysin
 3. Verbindung des aktivierten Zuckeranteils des TBG mit dem aktivierten Zuckeranteil der POD über einen Lysin-Spacer

3.2.6.1. Schematische Darstellung des Versuchsan-
satzes

- 1 mg TBG
- + 200 μ l 0,3 mol/l Bicarbonat
- + 20 μ l 10 g/l Fluordinitrobenzol
- 1 Stunde schütteln
- + 200 μ l 0,08 mol/l Natriumperjodat
- 30 min. schütteln
- + 100 μ l 0,16 mol/l Äthylenglycol
- 1 Stunde schütteln
- Entsalzen über Sephadex G-25 medium
- + 15 mg Lysin
- über Nacht bei 4°C inkubieren

Am nächsten Tag wurde der Zuckeranteil der POD akti-
viert:

- 5 mg POD
- + 1 ml 0,3 mol/l Bicarbonat
- + 100 μ l 10 g/l Fluordinitrobenzol
- 1 Stunde schütteln
- + 1 ml 0,08 mol/l Natriumperjodat
- 30 min. schütteln
- + 100 μ l 1,6 mol/l Äthylenglycol
- 1 Stunde schütteln
- Entsalzen über Sephadex G-25 medium

Beide Inkubationsgemische wurden gepoolt und über
Nacht bei 4°C kühl gestellt.

Danach wurden 5 mg Natriumborhydrid zugegeben.

- 3 Stunden bei Zimmertemperatur inkubieren
- in Kollodiumhülse auf ca. 500 μ l einengen
- chromatographische Trennung über AcA-44

3.2.6.2. Ergebnisse zu diesem Kopplungsverfahren

Das TBG-POD Konjugat wurde von Fraktion 29 bis Fraktion 32 nachgewiesen. Wie aus Abb. 15 deutlich wird, wurde in diesen Fraktionen die höchste Bindung an mit Antikörper beschichteten Tubes erreicht. Die Verdünnung der POD enthaltenden Fraktionen wurde so berechnet, daß in jeder Probe gleich viel TBG enthalten war.

Ungekoppeltes oder nur mit wenig POD gekoppeltes TBG fand sich in den Fraktionen 33 bis 36. Da noch eine Bindung des TBG-POD Konjugates an mit Antikörper beschichteten Küvetten gezeigt werden konnte, ließ sich nicht nachweisen, wieviel ungekoppeltes TBG in diesen Fraktionen enthalten war. Wiederum mußte TBG in einer wesentlich höheren Konzentration eingesetzt werden, um einen entsprechenden Substratumsatz zu erhalten (s. Abb. 15).

In den Fraktionen 37-42 des Elutionsprofils der AcA-44-Säule war die überschüssige POD enthalten. Abb. 15 zeigt, daß hier im RIA so gut wie kein TBG mehr gefunden wurde. Eine Bindung an die mit Antikörper beschichteten Küvetten fand nicht statt, obwohl in diesen Fraktionen eine hohe Aktivität der POD festgestellt werden konnte (s. Abb. 15).

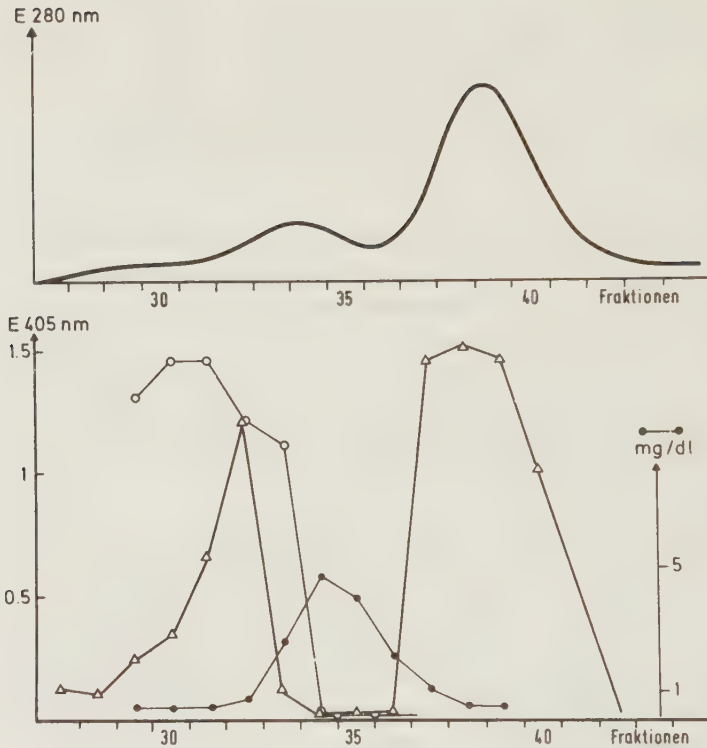


Abb. 15

oben: Elutionsprofil von der AcA-44-Säule
im RIA ermittelter TBG-Gehalt der einzelnen
Fraktionen
 ●—●—●
 Abszisse: Anzahl der Fraktionen à 4ml
 Ordinate: mg/dl TBG

▲—▲—▲
POD-Aktivität in den einzelnen Fraktionen
TBG-POD-Konjugat wurde durch einen Bindungs-
test an mit Antikörper beschichteten Tubes
ermittelt
 ○—○—○
 Abszisse: Anzahl der Fraktionen à 4ml
 Ordinate: Extinktion bei 280nm

3.3. Wirkungsprinzip des spezifischen Substratpuffers für die Peroxidase aus Meerrettich

Die Grundlösung des spezifischen Substratpuffers für die POD besteht aus 0,1 mol/l Natriumacetat, dem zur Stabilisierung des Reagenzienleerwertes 0,05 mol/l Natriumhydrogenphosphat zugesetzt wurde (14).

Das spezifische Substrat für die Peroxidase ist Wasserstoffperoxid; der Farbindikator ist ABTS [2,2'-Azino-di(3-ethyl-benzthiazolinsulfonsäure-(6))].

Katalysierte Reaktion:



Die Peroxidase katalysiert die Übertragung des Wasserstoffs vom ABTS auf das Wasserstoffperoxid, wobei das ABTS oxidiert wird. Durch diesen Oxydationsvorgang ändert es seine Farbe; es wird grün.

Nach Gallatti (14) nimmt die Affinität des ABTS zur Peroxidase mit steigendem pH-Wert ab; eine erhöhte Konzentration von ABTS führt zu einer Verschiebung der pH-Optima gegen den Neutralpunkt hin. Maximale Reaktionsgeschwindigkeit wird bei einem pH von 4,2 und einer ABTS-Konzentration von 2 mmol/l erreicht.

3.3.1. Austesten von verschiedenen Natriumperboratkonzentrationen des Substratpuffers

Es wurden 5 TBG-Standards mit einem TBG-Gehalt von jeweils 0, 0,5, 1,0, 2 und 4 mg/dl eingesetzt. Der ELISA wurde, wie unter 2.2.2.2.4. beschrieben, durchgeführt. Es wurden Substratpuffer mit Molartitäten von 1,25, 2,5, 5 und 10 mmol/l Perborat/l Substratpuffer benutzt.

Die Enzymaktivität wurde nach 10 min und nach 25 min bei 405nm im Photometer gemessen.

Die Substratreaktion lief umso schneller ab, je höher die Perboratkonzentration im Substratpuffer war (Abb.16).

Die Extinktion der Proben wurde jeweils nach 10 min und nach 25 min gemessen. Wie Abb.16 zeigt, war die Steilheit der Eichkurven auch von der Inkubationszeit mit Substratpuffer abhängig. Je länger die Proben mit dem Substratpuffer inkubiert worden waren, desto steiler wurden die Eichkurven.

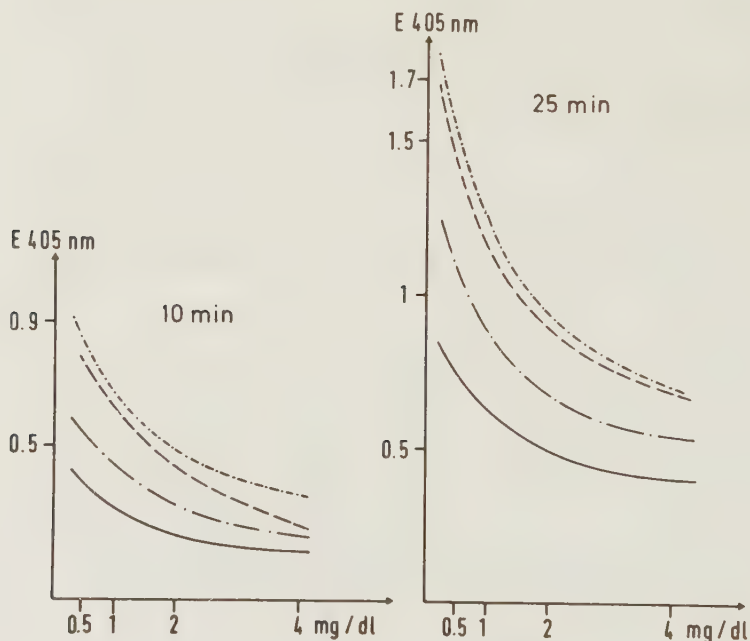


Abb.16 TBG-Eichkurven mit 4 verschiedenen Natriumboratkonzentrationen des Substratpuffers

links: nach 10 Minuten mit Substratpuffer

rechts: nach 25 Minuten mit Substratpuffer

Abszisse: mg% TBG

Ordinate: Extinktion E bei 405nm

4. ERGEBNISSE =====

4.1. Vergleich der verschiedenen Verfahren der TBG- POD-Kopplung

Die Ergebnisse der 3 Kopplungsverfahren sind in Tab.2 aufgeführt.

Als Extinktion wurde die Bindung der jeweiligen TBG-POD-Konjugate an mit Antikörper beschichteten Küvetten angenommen. Bei den TBG-Werten handelt es sich um die TBG-Konzentrationen, die eingesetzt werden mußten, um diese Extinktionen zu erreichen.

Wie man aus Tab.2 deutlich erkennen kann, muß bei der Kopplung des TBG an den aktivierten Zuckeranteil der POD am wenigsten TBG eingesetzt werden, um eine bestimmte Extinktionsänderung zu erreichen.

4.2. Ergebnisse zum TBG-Enzymimmunoassay

4.2.1. TBG-Antikörperkonzentration zum Beschichten der Küvetten

Dem TBG-RIA vergleichbare Eichkurven erhielt man, wenn der TBG-Antikörper zum Beschichten der Küvetten in einer Verdünnung von 1:4000 vorlag. Bei dieser Antikörperverdünnung lagen die im Normalserum gemessenen TBG-Konzentrationen im steilsten Bereich der Eichkurve, der durch den 50%-Intercept (hier: 0,966 mg/dl) gekennzeichnet wird (s. Abb.17). Der Normalbereich für das TBG liegt zwischen 1,5 und 2,8 mg/dl.

4.2.2. Kalibrierstandardkurve für das TBG

Die Eichstandards für die Kalibrierstandardkurve des TBG reichen von 0 mg/dl über 0,25, 0,5, 1,0, 2 und 4 mg/dl bis hin zum höchsten Standard mit einem TBG-Gehalt von 8 mg/dl.

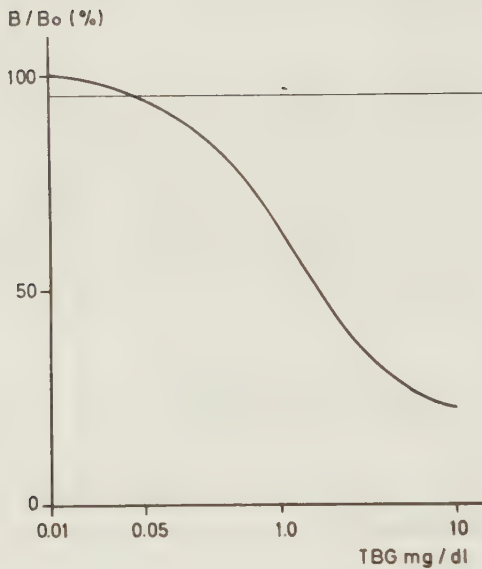


Abb. 17 Kalibrierstandardkurve des TBG

Untere Nachweisgrenze: $90,5\% = 0,078 \text{ mg/dl}$

50%-Intercept: $0,966 \text{ mg/dl}$

Ordinate: %-Bindung des TBG-POD Konjugates

Abszisse: mg/dl TBG

4.2.3. Qualitätskontrolle des TBG-Enzymimmunoassays

4.2.3.1. Präzision

Bei den Messungen an verschiedenen Tagen ergab sich für ein Serum mit einem TBG-Gehalt von 1,3 mg/dl ein Interassay-Variationskoeffizient von 12%, für ein Serum, mit einem TBG-Gehalt von 2,7 mg/dl, errechnete sich ein Interassay-Variationskoeffizient von 9,1%. Hierzu wurden die Seren an 10 verschiedenen Tagen bestimmt.

Für den Intraassay-Variationskoeffizienten wurde ein Serum jeweils 23 mal in Serie bestimmt. Es ergab sich dabei für ein Serum mit einem TBG-Gehalt von 1,4 mg/dl ein Variationskoeffizient von 6,6%. Für ein Serum mit einem TBG-Gehalt von 2,7 mg/dl wurde ein Intraassay-Variationskoeffizient von 8,4 % errechnet.

4.2.3.2. Vergleich der Meßwerte von RIA und EIA

Die Richtigkeit der Messungen des Enzymimmunoassays wurde anhand der Übereinstimmung mit radioimmunologisch ermittelten Meßwerten gezeigt.

Die Messungen ergaben einen Korrelationskoeffizienten von 0,984, einen Regressionskoeffizienten von 1,025 und einen y-Achsenabschnitt ($x=0$) von -0,092. Verglichen wurden 153 Meßwerte (s. Abb. 18). Beim gepaarten Wilcoxon-Test ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zum Radioimmunoassay.

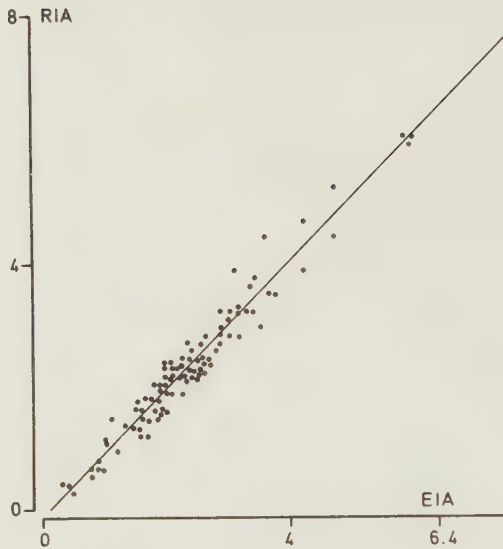


Abb.18

Vergleich der Meßergebnisse von
RIA und EIA mittels einer Punkte-
wolke dargestellt

Abszisse: Meßergebnisse EIA

Ordinate: Meßergebnisse RIA

Korrelations-
koeffizient r: 0,984

Regressions-
koeffizient b: 1,025

y-Achsenabschnitt
($x = 0$) : - 0,092

4.3. Ergebnisse zum T₄-Enzymimmunoassay

4.3.1. T₄-Antikörperkonzentration zum Beschich-
ten der Küvetten

Die steilste Eichkurve wurde bei einer T₄-Antikörperverdünnung von 1:6000 erzielt. Bei dieser Verdünnung des Antikörpers befanden sich die im Normalserum gemessenen T₄-Konzentrationen im steilsten Bereich der Eichkurve, der durch den 50%-Intercept (hier: 4,602 µg/dl) gekennzeichnet ist (Abb.19).

Der Normalbereich für das Thyroxin liegt zwischen 4,5 und 10 µg/dl.

4.3.2 Kalibrierstandardkurve des T₄

Die Eichstandards für die Kalibrierstandardkurve des T₄ reichen von 0 µg/dl über 1,5, 3, 6, 12 und 24 µg/dl bis zu 48 µg/dl als dem höchsten T₄-Eichstandard.

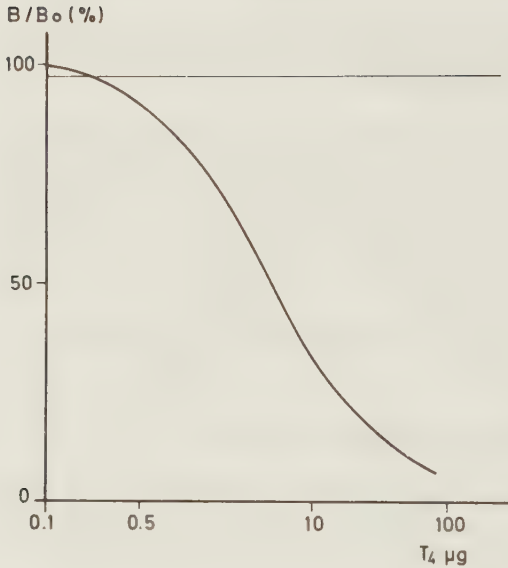


Abb.19

Kalibrierstandardkurve des T_4

Untere Nachweisgrenze: $98,6\% = 0,139 \mu\text{g/dl}$

50%-Intercept: $4,602 \mu\text{g/dl}$

Ordinate: Bindung des T_4 -POD-Konjugates

Abszisse: $\mu\text{g/dl } T_4$

4.3.3. Qualitätskontrolle des T_4 -Enzymimmunoassays

4.3.3.1. Präzision

Bei den Messungen an verschiedenen Tagen ergab sich für ein Serum mit einem T_4 -Gehalt in der Größenordnung von 5 $\mu\text{g/dl}$ ein Interassay-Variationskoeffizient von 8,4%, für ein Serum mit einem T_4 -Gehalt in der Größenordnung von 13 $\mu\text{g/dl}$ errechnete sich ein Variationskoeffizient von 11,7%.

Hierzu wurden die Seren an 7 verschiedenen Tagen bestimmt. Für den Interassay-Variationskoeffizienten wurde ein Serum jeweils 22 mal in Serie bestimmt.

Es ergab sich dabei für ein Serum mit einem T_4 -Gehalt in der Größenordnung von 5 $\mu\text{g/dl}$ ein Variationskoeffizient von 7,1%. Für ein Serum mit einem T_4 -Gehalt von 13 $\mu\text{g/dl}$ wurde ein Interassay-Variationskoeffizient von 7,6% errechnet.

4.3.3.2. Vergleich der Meßwerte von RIA und EIA

Als Vergleichsmethode zum Nachweis der Richtigkeit der Messungen im T_4 -EIA stand die radioimmunologische Bestimmungsmethode zur Verfügung.

Die Messungen ergaben einen Korrelationskoeffizienten r von 0,989; einen Regressionskoeffizienten b von 1,011 und einen Wert für den y -Achsenabschnitt ($x = 0$) von - 0,101. Verglichen wurden 137 Meßwerte (Abb.20). Beim gepaarten Wilcoxon-Test ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zum Radioimmunoassay.

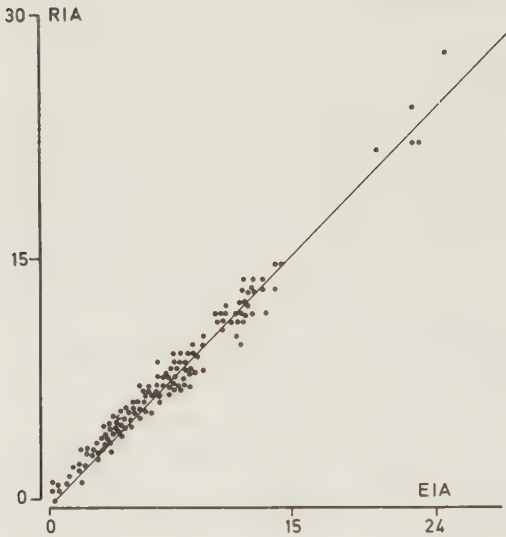


Abb.20

Vergleich der Meßergebnisse von RIA
und EIA mittels einer Punktwolke
dargestellt

Abszisse: Meßergebnisse EIA

Ordinate: Meßergebnisse RIA

Korrelations-
koeffizient r : 0,989

Regressions-
koeffizient b : 1,011

y-Achsenabschnitt
($x=0$) : -0,101

4.3.3.3. TBG-Unabhängigkeit

Zum Beweis der TBG-Unabhängigkeit der Messungen wurde ein Serum mit einem T_4 -Gehalt von 16 $\mu\text{g/dl}$ und einem TBG-Gehalt von 5 mg/dl und zum Vergleich ein Serum mit einem T_4 -Gehalt von 16 $\mu\text{g/dl}$ und einem TBG-Gehalt von 2 mg/dl jeweils 1:2, 1:4 und 1:8 in T_4 -Nullserum verdünnt.

Tab.3 Verdünnungsreihen von 2 Seren mit einem T_4 -Gehalt von 16 $\mu\text{g/dl}$, von denen ein Serum einen hohen, das andere einen niedrigen TBG-Wert aufweist

Verdünnung	[mg/dl] TBG (errech.)	[$\mu\text{g/dl}$] T_4 Soll- Wert	[$\mu\text{g/dl}$] T_4 Ist- Wert	[mg/dl] TBG (errech.)	[$\mu\text{g/dl}$] T_4 Soll- Wert	[$\mu\text{g/dl}$] T_4 Ist- Wert
unverdünnt	5	15,7	15,7	2	15,4	15,4
1 : 2	(2,5)	7,85	7,7	(1)	7,7	7,5
1 : 4	(1,25)	3,9	3,7	(0,5)	3,85	3,8
1 : 8	(0,625)	1,95	1,6	(0,25)	1,9	1,7

Tab.3 zeigt, daß alle Werte der beiden Serumverdünnungen gleichermaßen auf der Eichkurve liegen.

Der Enzymimmunoassay für das T_4 ist also unabhängig vom TBG-Gehalt der Seren.

4.3.3.4. "Wiederfindung" von T₄-Standards

Zu einem Serum, mit einem T₄-Gehalt von 6,6 µg/dl wurden Eichstandards von 0-24 µg/dl pipettiert. Die Wiederfindung für die eingesetzten T₄-Standards betrug im Mittel 104,3% (Tab.4).

Tab.4

zugesetzter T ₄ -Standard	Sollwert [µg/dl]	Ist-Wert [µg/dl]	Wiederfindung in %
0	6,6	6,6	100
1,5	4,0	4,09	102,25
3,0	4,8	4,8	100
6,0	6,3	6,6	104,8
12,0	9,3	10,35	111,3
24,0	15,3	16,5	107,8

4.4. Ergebnisse zum T_3 -Enzymimmunoassay

4.4.1. T_3 -Antikörperkonzentration zum Beschichten der Küvetten

Bei der optimalen Verdünnung des T_3 -Antiserums von 1:20 000 lagen die im Normalbereich gemessenen T_3 -Konzentrationen im steilsten Bereich der Eichkurve, der durch den 50%-Intercept (hier: 107,7 ng/dl) gekennzeichnet ist (Abb.21).

Der Normalbereich für das T_3 liegt zwischen 80 und 200 ng/dl.

4.4.2. Kalibrierstandardkurve des T_3

Die Eichstandards für die Kalibrierstandardkurve des T_3 reichen von 0 ng/dl über 25, 50, 100, 200 und 400 ng/dl bis zum höchsten T_3 -Standard, mit 800 ng/dl T_3 -Gehalt.

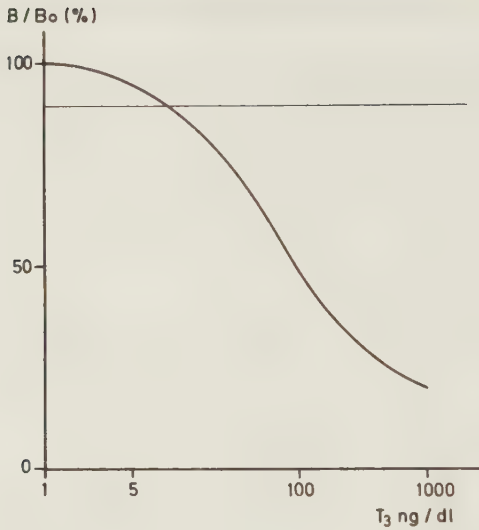


Abb.21

Kalibrierstandardkurve des T_3

Untere Nachweis-
grenze:

96,4% = 3,27 ng/dl

50%-Intercept:

107,7 ng/dl

Ordinate:

%-Bindung des T_3 -POD-Konjugates

Abszisse:

ng/dl T_3

4.4.3. Qualitätskontrolle des T₃-Enzymimmunoassays

4.4.3.1. Präzision

Bei den Messungen an verschiedenen Tagen ergab sich für ein Serum mit einem T₃-Gehalt von 150 ng/dl ein Interassay-Variationskoeffizient von 11,7%, für ein Serum mit einem T₃-Gehalt in der Größenordnung von 600 ng/dl errechnete sich ein Variationskoeffizient von 6,9%.

Hierzu wurden die Seren an 7 verschiedenen Tagen bestimmt. Für den Intraassay-Variationskoeffizienten wurde ein Serum jeweils 14 mal in Serie gemessen. Es ergab sich dabei für ein Serum mit einem T₃-Gehalt in der Größenordnung von 120 ng/dl ein Variationskoeffizient von 11,0%. Für ein Serum mit einem T₃-Gehalt in der Größenordnung von 290 ng/dl wurde ein Intraassay-Variationskoeffizient von 4,12% errechnet.

4.4.3.2. Vergleich der Meßwerte von RIA und EIA

Der Radioimmunoassay stand als Referenzmethode für die Richtigkeit der Messungen zur Verfügung.

Es ergab sich ein Korrelationskoeffizient r von 0,987, ein Regressionskoeffizient b von 0,986 und ein Wert für den y -Achsenabschnitt ($x = 0$) von - 0,138. Den Bestimmungen lagen 54 Wertepaare zugrunde.

Beim gepaarten Wilcoxon-Test ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zum Radioimmunoassay.

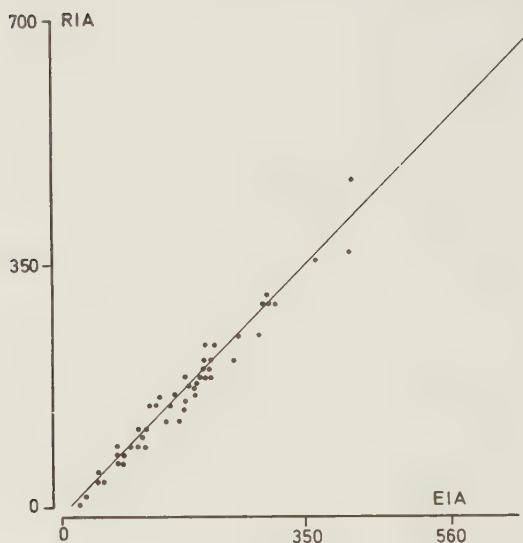


Abb.22 Vergleich der Meßergebnisse von RIA
und EIA mittels einer Punktwolke
dargestellt

Abszisse: Meßergebnisse EIA

Ordinate: Meßergebnisse RIA

Korrelationskoeffizient r : 0,987

Regressionskoeffizient b : 0,986

y-Achsenabschnitt ($x = 0$): - 0,138

4.4.3.3. TBG-Unabhängigkeit

Um die TBG-Unabhängigkeit der Messungen zu beweisen, wurde ein Serum mit einem T_3 -Gehalt von 113 ng/dl und einem hohen TBG-Gehalt von 4,2 mg/dl und zum Vergleich ein Serum mit einem T_3 -Gehalt von 125 ng/dl und einer TBG-Konzentration von 1,8 mg/dl jeweils 1:2, 1:4 und 1:8 in T_3 -Nullserum verdünnt.

Tab.5 Verdünnungsreihen von 2 Seren mit einem T_3 -Gehalt in der Größenordnung von 120 ng/dl, von denen ein Serum einen hohen, das andere einen niedrigen TBG-Wert aufweist

Verdünnung	[mg/dl]	[ng/dl]	[ng/dl]	[mg/dl]	[ng/dl]	[ng/dl]
	TBG (errech.)	T_3 Soll- wert	T_3 Ist- Wert	TBG (errech.)	T_3 Soll- wert	T_3 Ist- Wert
unverdünnt	4,2	113,7	113,7	1,8	125	125
1 : 2	(2,1)	56,85	56,5	(0,9)	64,5	64,2
1 : 4	(1,05)	28,5	30,96	(0,45)	32,25	31,8
1 : 8	(0,525)	14,25	15,34	(0,225)	16,2	16,5

Wie aus Tab.5 ersichtlich wird, lagen alle Werte der beiden Serumverdünnungen in gleicher Weise auf der Eichkurve. Das zeigt, daß der T_3 -Enzymimmunoassay unabhängig vom TBG-Gehalt der Seren mißt.

4.4.3.4. "Wiederfindung" von T₃-Standards

Zu einem Serum mit einem T₃-Gehalt von 70 ng/dl wurden T₃-Eichstandards von 0-400 ng/dl pipettiert. Die Wiederfindung für die einzelnen T₃-Standards betrug im Mittel 101,5% (Tab. 6).

Tab.6

zugesetzter T ₃ -Standard	Sollwert in ng/dl	Ist-Wert in ng/dl	Wiederfindung in %
0	70	70	100
25	47,5	46,3	97,23
50	60	63,8	102,08
100	85	87,2	104,64
200	135	137,8	102,07
400	235	242,4	103,14

5. DISKUSSION
=====

Die Schilddrüsenhormone Thyroxin (T_4) und Trijodthyronin (T_3) sind im Serum hauptsächlich an das Thyroxin bindende Globulin, das TBG, gebunden. TBG ist die wichtigste Einflußgröße auf T_4 - und T_3 -Konzentrationen im Serum.

Weder die T_4 - noch die T_3 -Bestimmung hat für sich allein eine ausreichende diagnostische Trennschärfe, um den Funktionszustand der Schilddrüse beurteilen zu können.

So können erhöhte Schilddrüsenhormonspiegel trotz euthyreoter Stoffwechsellaage durch erhöhte TBG-Spiegel, z.B. bei Gravidität, unter Östrogentherapie, bei genetisch bedingtem TBG-Exzeß oder bei kompensierter Leberzirrhose auftreten. Erniedrigte T_4 - und T_3 -Spiegel können durch erniedrigte TBG-Konzentrationen, z.B. bei katabolen Stoffwechselveränderungen, bei genetisch bedingtem TBG-Mangel, bei dekompenzierter Leberzirrhose, eiweißverlierenden Nephropathien und Enteropathien hervorgerufen werden.

Welch geringe Aussagekraft T_3 - und T_4 -Spiegel ohne dazugehörige TBG-Werte haben, veranschaulicht die folgende Kasuistik:

T_4	2,6	2,8	$\mu\text{g/dl}$
TBG	-	0,3	mg/dl
T_4/TBG	-	9,3	-
T_3	32	37	ng/dl
TSH_0	0,8	0,4	$\mu\text{E/ml}$
TSH_{30}	0,8	0,4	$\mu\text{E/ml}$
Fehldiagnose:		Richtige Diagnose:	
sekundäre		Hyperthyreose	
Hypothyreose		TBG-Mangel	

Daher muß eine zusätzliche Bestimmung zur Erfassung der Konzentrationen von Transportproteinen durchgeführt werden. Früher ermittelte man die TBG-Konzentrationen im Serum indirekt mit Hilfe des T_3 -in vitro-Tests oder der T_4 -Bindungskapazität des Serums. Anstelle dieser Bindungstests wurde eine spezifische, quantitative Bestimmungsmethode für TBG angewandt, der TBG-RIA (17). Die Vorzüge dieser Art der TBG-Bestimmung gegenüber indirekten Meßverfahren liegen auf der Hand:

- Durch den RIA wird eine direkte, quantitative Bestimmung des wichtigsten Transportproteins für Schilddrüsenhormone ermöglicht.
- Es handelt sich um ein spezifisches Meßverfahren, d.h., die Messungen sind unabhängig von endogenen T_4 - und T_3 -Konzentrationen.
- In Grenzbereichen wird eine bessere Trennschärfe erzielt, als dies bei indirekten Meßmethoden der Fall war (29).

Diagnostische Bedeutung hat die Berechnung des T_4 /TBG-Quotienten, mit dem Änderungen der Gesamt- T_4 -Spiegel aufgrund von veränderten TBG-Konzentrationen erkannt werden können.

Beim Aufbau spezifischer Bestimmungsverfahren für T_4 und T_3 beruht die Problematik der Schilddrüsenhormonanalyse darauf, daß nur weniger als 1% der Schilddrüsenhormone im Blut in freier, ungebundener Form vorliegen. Der weitaus größte Anteil der Hormone ist proteingebunden, wobei das TBG den quantitativ höchsten Anteil von T_4 und T_3 bindet. Als weitere Transportproteine sind das Thyroxin bindende Präalbumin (TBPA) und das Albumin (TBA) zu nennen, denen jedoch nur unwesentliche Bedeutung zukommt.

Aufgrund dieser Tatsachen wird erkenntlich, daß die Schilddrüsenhormonbestimmung im Serum nicht unproble-

matisch ist. Die Assoziationskonstante des TBG zu T_4 bzw. T_3 liegt in der gleichen Größenordnung wie die der entsprechenden Antikörper. Bisher konnten T_4 - und T_3 -Bestimmungen im unextrahierten Serum nur durchgeführt werden, wenn Substanzen wie ANS (8-Anilin-1-Naphtalin-Sulfonsäure) (20), die die Bindung der Schilddrüsenhormone an TBG blockieren, verwendet wurden. Da diese T_4 und T_3 nicht nur vom TBG, sondern auch vom jeweiligen Antikörper verdrängen, wird die Genauigkeit dieser Assays durch unterschiedliche, endogene TBG-Konzentrationen in den Serumproben beeinflusst. Deshalb wurde analog zum bereits publizierten Radioimmunoassay (RIA) für T_4 und T_3 (11) ein Enzymimmunoassay (EIA) aufgebaut, der auf dem Prinzip der Bindung der Antikörper in extremen pH-Bereichen beruht.

Beim T_4 -EIA wurden vor dem Umpuffern auf pH 5,0 (Inkubationsansatz) TBG und andere bindende Proteine durch Zugabe von 0,1 mol/l HCl denaturiert. Die immunologischen Eigenschaften des an die Küvettenwand adsorbierten Antikörpers gingen bei dieser Prozedur nicht verloren; der in Lösung befindliche Antikörper wäre durch die Salzsäure zerstört worden (11). Bei einem pH von 3,8, bei dem der T_4 -RIA stattfindet, ist die Peroxidase nicht mehr aktiv, deshalb wird beim Inkubationsansatz für den EIA vor Zugabe des Enzyms auf pH 5,0 umgepuffert.

Entsprechend konnte zum Beschichten der Küvetten für den T_3 -EIA ein Antikörper benutzt werden, dessen optimale Bindung in einem pH-Bereich von 9,0-10,0 liegt. Bevor auf diesen pH umgepuffert wurde, wurden TBG und andere bindende Proteine mit 0,15 mol/l NaOH denaturiert. Dadurch entfällt wiederum die Zugabe von TBG-blockierenden Substanzen; der an die Küvettenwand adsorbierte Antikörper wird in seinen immunologischen Eigenschaften nicht beeinträchtigt. Obwohl Antikörper zur Verfügung

standen, die im sauren pH-Bereich binden, konnte der T_3 -EIA nicht analog zum T_4 -EIA durchgeführt werden, da der T_3 -EIA genauso wie der T_3 -RIA im sauren pH-Bereich nicht die Kriterien der Richtigkeit (11) erfüllte. Auch die Annahme, daß es durch die größere Serummenge beim T_3 -EIA zur Ausfällung von Serumproteinen kommen könnte, erwies sich nicht als Grund dafür, daß im sauren pH-Bereich die Kriterien der Richtigkeit nicht erfüllt wurden; mit geringeren Serumengen wurden ebenfalls falsche Meßwerte erzielt.

Eine zusätzliche Bestimmung der Bindungsparameter für T_4 und T_3 ist unbedingt erforderlich, um Änderungen der Gesamt- T_4 -Spiegel, die durch Alterationen der TBG-Konzentrationen hervorgerufen werden, zu erkennen.

Als direktes Meßverfahren für das TBG ist der von K.Horn (17) aufgebaute TBG-RIA den indirekten Bestimmungsverfahren auch durch bessere Möglichkeiten der Standardisierung und Automatisierung und durch höhere Spezifität überlegen.

Um die Nachteile des RIA zu umgehen, wurde ein TBG-EIA aufgebaut; Markierungssubstanz war die Peroxidase aus Meerrettisch (POD).

Zunächst mußte ein bindungsfähiges Enzym-Hormon-Konjugat hergestellt werden. Um bei der Kopplung eine möglichst große Ausbeute an bindendem TBG-POD-Konjugat - d.h., möglichst viele POD-Moleküle sollten an ein Molekül TBG gekoppelt werden - zu erzielen, wurden verschiedene Kopplungsverfahren ausgetestet. Bei der Kopplung von TBG an den aktivierten Zuckeranteil der POD wurde die größte Ausbeute an bindendem TBG-POD-Konjugat erreicht.

Eine nur geringe Kopplungsausbeute wurde durch die Bindung von POD an die NH_2 -Gruppen des TBG erzielt. Dies liegt darin begründet, daß bei kommerziell erhältlicher POD die α - und ϵ -Aminogruppen durch Alkylisothiocyanat blockiert sind (25).

Die TBG-Konzentration in dem Konjugat ist geringer als im niedrigsten Standard; das TBG-POD-Konjugat ist also ein echter "Tracer". Im niedrigsten Standard befinden sich

25 ng TBG, im TBG-POD-Konjugat wurden ca. 10-15 ng TBG eingesetzt.

Als weitere Schwierigkeit bei der TBG-Bestimmung erweist sich seine hohe Serumkonzentration; die Antikörperbindungskapazität der Polyesterolküvetten ist jedoch begrenzt. Um eine Affinitätschromatographie von TBG-Antiserum an TBG-Sepharose zu umgehen, konnten nur Antiseren mit sehr hohem Titer verwendet werden. Wäre der Antikörper nicht in ausreichendem Maß an die Küvettenwand adsorbiert, müßten die Seren vorverdünnt werden, längere Inkubationszeiten wären die Folge.

Mit 10 μ l Serum konnte nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden ein Bindungsplateau erreicht werden, da hochtitrige Antiseren zur Verfügung standen, die eine Affinitätschromatographie unnötig machten.

Die Meßergebnisse der Enzymimmunoassays waren denen der radioimmunologischen Bestimmungen mit Variationskoeffizienten, die zumeist niedriger als 10% waren, in Präzision, Richtigkeit, Spezifität und Sensitivität vergleichbar. Das Für und Wider des Enzymimmunoassays sei hier noch kurz diskutiert:

Der größte Vorteil des EIA liegt wohl in der Umgehung der Radioaktivität; die radioaktive Markierung des Antigens entfällt ebenso wie die nicht unerheblichen Kosten zur Beseitigung von radioaktiven Abfällen.

Die Enzymkonjugate sind über nahezu unbegrenzte Zeit haltbar, wogegen die radioaktiven Tracer schon nach wenigen Wochen an Stabilität verlieren.

Durch weitgehende Automatisierung (4, 13, 31, 35, 40) sind beim Enzymimmunoassay weniger Arbeitsschritte als beim RIA erforderlich. So entfällt z.B. das für den RIA notwendige, zweimalige Zentrifugieren der Proben, die Messung der Enzymaktivität erfolgt durch den Automaten. Zwar müssen zur Durchführung des EIA Küvetten beschichtet werden und die Zugabe des Substratpuffers muß ebenso wie die Messung der Enzymaktivität im genauen Zeittakt erfolgen, da

dies jedoch alles automatisch geschieht, sind das keine wirklichen Nachteile des Enzymimmunoassays.

Da die Vorteile des EIA denen der radioimmunologischen Bestimmungsmethoden weit überlegen sind, wäre es als Facit wünschenswert, den RIA für T_4 , T_3 und TBC in der Routinediagnostik baldmöglichst durch den Enzymimmunoassay abzulösen. Die Anwendung des Enzymimmunoassay für diese drei Parameter ist aber nur sinnvoll, wenn alle Verfahren in der Schilddrüsenbasisdiagnostik einheitlich nach einem Prinzip gemessen werden können. Dazu gehört die TSH-Bestimmung, die derzeit noch radioimmunologisch durchgeführt wird. Voraussetzung zur endgültigen Ablösung des RIA durch den Enzymimmunoassay ist der Aufbau eines ELISA für das TSH (Thyreoida stimulierendes Hormon).

6. ZUSAMMENFASSUNG =====

Als ein dem RIA in Spezifität und Richtigkeit vergleichbares Meßverfahren wurden Enzymimmunoassays für TBG, T_3 und T_4 nach der ELISA-Technik aufgebaut.

Als Indikatorenzym wurde die Peroxidase aus Meerrettich verwendet, ABTS diente als Indikatorfarbstoff, Natriumperborat als Substrat. Eine Optimierung des Nachweises der Enzymaktivität wurde durch die Verwendung eines Acetattuffers mit einem pH von 4,2 erreicht.

T_4 und T_3 wurden über einen Hydroxysuccinimidester an POD gekoppelt.

Bei der Herstellung des TBG-POD-Konjugates wurde durch Kopplung des TBG an den mit Natriumperjodat aktivierten Zuckeranteil der POD die beste Kopplungsausbeute erzielt. Die beste Abtrennung des Konjugates von nicht gekoppeltem TBG und überschüssiger POD erhielt man über eine AcA-44-Säule.

Bei der ELISA-Technik ist der Antikörper an die Wand von Polyesterolküvettenadsorbiert. Da deren Antikörperbindungskapazität jedoch begrenzt ist, wurden die Gammaglobulinfractionen der Antiseren durch eine einfache Chromatographie über ein Protein A-Sepharose-Säulchen präpariert. Beim T_4 -EIA wurden TBG und andere bindenden Proteine im Serum durch HCl denaturiert, bevor auf pH 5,0, bei dem der Inkubationsansatz stattfand, umgepuffert wurde. Bevor beim T_3 -EIA auf pH 9,2 (Inkubationsansatz) umgepuffert werden konnte, wurde TBG, ebenso wie die anderen bindenden Proteine durch Zugabe von NaOH denaturiert. Beim TBG-EIA wurden Variationskoeffizienten von 6,6-12% erzielt, beim T_4 -EIA lagen sie zwischen 7,1 und 11,7%. Variationskoeffizienten von 6,85-11,7% errechneten sich aus den Meßergebnissen des T_3 -EIA. Die TBG-Unabhängigkeit bei den enzymimmunologischen Bestimmungen für T_4 und T_3 wurde durch Serumverdünnungsreihen und Standardwiederfindung bewiesen. Die Korrelation zwischen RIA und EIA ist mit Korrelationskoeffizienten von 0,985-0,987 sehr zufriedenstellend. Die

Meßergebnisse aller drei Enzymimmunoassays sind denen des RIA in Spezifität, Präzision, Richtigkeit und Sensitivität gleichzusetzen.

7. LITERATURVERZEICHNIS
=====

1. Avrameas, S., Guilbault, B.:
Enzyme-immunoassay for the measurement
of antigenes using peroxidase conjugates.
Biochemie 54, 837-842 (1972)
2. Bastiani, R.J.:
The EMIT-System: A commercially successful
innovation.
Antibiot.Chemother. 26, 89-97 (1979)
3. Bastiani, R.J., Phillips, R.C., Schneider, R.S., Ullman, E.F.:
Homogeneous immunochemical drug assays.
Am.J.Med.Technol. 39, 211 (1973)
4. Bhatia, H.:
Semiautomated homogeneous enzyme immuno-
assay of total serum thyroxine with a kine-
tic analyzer.
Clin.Chem. 26 (3), 501-3 (1980)
5. Borner, K., Colombo, J.P., Bachmann, C., Haeckel, R.,
Oellerich, M., Westerink, D., Fischer, M., Wimmer, P.,
Vogt, W., Tausch, A., Knedel, M., Minder, W., Blum, J.,
Portenhauser, R.:
Bestimmung von Thyroxin im Serum mit einem
heterogenen Enzymimmunoassay: Ergebnisse
einer gemeinsamen Erprobung.
J.Clin.Chem.Clin.Biochem. 17, 471-81
(1979)
6. Brown, P.A.:
A large private laboratory looks at immuno-
assay.
Antibiot.Chemother. 26, 98-104 (1979)
7. Cruse, K.L.:
Evaluation of homogeneous enzyme immuno-
assay of serum thyroxine with the Gilford
3500 Analyzer.
Clin.Chem. 25, 1469-71 (1979)
8. Delvigne, L., Treigner, A., Olive, G., Chaussain, J.L.,
Georges, P.:
Measurement of serum thyroxine by homo-
geneous enzyme immunoassay in normal
children and in thyroid disorders.
pp.189-93, PAL SB, ED. Enzyme labelled
immunoassay of hormones and drugs.
Berlin, De Gruyter, 1978

9. Engvall, E., Perlmann, P.:
Enzyme-linked immuno sorbent assay
(ELISA).
Biochem. Biophys. Acta 251 (1971), 427-34
10. Finley, P.R., Williams, R.J.:
Evaluation of homogeneous enzyme immuno-
assay of serum thyroxine with use of
biochromatic analysis.
Clin. Chem. 24, 165-167 (1978)
11. Gärtner, R., Kewenig, M., Horn, K., Scriba, P.C.:
A new principle of thyroxine (T_4) and
Triiodothyronine (T_3) radioimmunoassay
in unextracted serum using antisera with
binding optima at extreme pH-ranges.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 571-577 (1980)
12. Gärtner, R., Henze, R., Horn, K., Pickardt, C.R., Scriba, P.C.:
Thyroxine-binding-globulin: Investigation
of microheterogeneity.
J. Clin. Endocrin. Met. Vol. 52, No. 4, 657-664
(1981)
13. Galen, R.S., Forman, D.:
Enzyme immunoassay of serum thyroxine with
the "Auto Chemist" multichannel analyzer.
Clin. Chem. 23, 119 (1977)
14. Gallatti, H.:
Peroxidase aus Meerrettich : Kritische Stu-
dien sowie Optimierung der Aktivitätsbe-
stimmung mit den Substraten H_2O_2 und
2,2'-Azino-di-(3-ethyl-benzthiazolinsulfon-
säure-(6)) (ABTS).
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 17, 1-7 (1979)
15. Gnemmi, E., O'Sullivan, M.J., Chierigatti, G., Simmons, M.,
Simmonds, A., Bridges, J.W., Marks, V.:
A sensitive immunoenzymometric assay (IEMA)
to quantitate hormones and drugs.
pp. 29-41.
PAL SB, ED. Enzyme labelled immunoassay
of hormones and drugs.
Berlin, de Gruyter, 1978
16. Gustafsson, J.E.:
Homogeneous enzyme immunoassay for thyroxine
compared with a radioimmunoassay technique.
Clin. Chem. 25, 1476-9 (1979)
17. Horn, K., Kubiczek, Th., Pickardt, C.R., Scriba, P.C.:
Thyroxin-bindendes Globulin (TBG): Präparation,
radioimmunologische Bestimmung und klinisch-
diagnostische Bedeutung.
Klin. Wschr. 55, 881-894 (1977)

18. Jaklitsch, A.P., Schneider, R.S., Johannes, R.J.,
Lavine, J.E., Rosenberg, G.L.:
Homogeneous enzyme immunoassay for T_4 in
serum.
Clin.Chem. 22, 1185 (1976)
19. Kevin Catt, Tregear, G.W.:
Solid-Phase-Radioimmunoassay in
Antibody-Coated Tubes.
Science Vol.158, 1570-1571 (1967)
20. Kleinhammer, G., Lenz, H., Linke, R., Staehler, F.:
Enzymimmunologische Bestimmung von
 T_4 und T_3 in antikörperbeschich-
teten Gläsern.
W.Vogt: Enzymimmunoassay, Stuttgart ,
42-51 (1978)
21. Marschner, J., Dobry, H., Erhardt, F., Landersdorfer, T.,
Popp, B., Ringel, L., Scriba, P.C.:
Berechnung radioimmunologischer Meßwer-
te mittels Spline-Funktionen.
Ärztl.Lab. 20, 184 (1974)
22. McReynolds, C.W., Schoder, S.M., Schneider, R.S.:
Homogeneous enzyme immunoassay for
serum thyroxine on the ABA-100.
Clin.Chem. 23, 1123 (1977)
23. Miedema, K., Boelhouwer, J., Otten, J.W.:
Determinations of proteins and hor-
mones in serum by an immunoassay using
antigen-enzyme conjugates.
Clin.Chem. Acta 40, 187-192 (1972)
24. Miyai, K., Ishibashi, K., Ogihara, T., Tanizawa, O.,
Nishi, K., Kawashima, M., Kumahara, Y.:
Evaluation of enzyme-immunoassay
of hormones for clinical application.
pp.287-99
PAL SB, ED. Enzyme labelled immunoassay
of hormones and drugs.
Berlin, de Gruyter (1978)
25. Nakane, P.K., Kawaoi, Akira:
Peroxidase-labeled antibody - a new
method of conjugation.
J.of Histochemistry and Cytochemistry,
12, 1081-91 (1974)
26. Oellerich, M.:
Enzyme Immunoassays in Clinical Chemistry:
Present status and trends.
J.Clin.Chem.Biochem. 18, 197-208
(1980)

27. Oellerich, M., Haindl, H., Haeckel, R.:
Evaluation of enzyme immunoassays
for determination of thyroxine (EMIT,
Enzymun) and of thyroxine binding index.
J.Clin.Chem.Clin.Biochem., 17, 483-8
(1979)
28. O'Sullivan, M.J., Gnemmi, E., Morris, D., Al-Bassam,
M.N., Simmons, M., Bridges, J.W., Marks, V.:
An enzyme-immunoassay for triiodothyro-
nine. pp.301-10.
PAL SB, ED. Enzyme labelled immunoassay
of hormones and drugs.
Berlin, de Gruyter (1978)
29. Pickardt, C.R., Bauer, M., Horn, K., Kubiczek, T.,
Scriba, P.C.:
Vorteile der direkten Bestimmung des TBG
(Thyroxin bindendes Globulin) in der
Schilddrüsenfunktionsdiagnostik.
Der Internist 18, 538-543 (1977)
30. Plomp, T.A., Drost, R.H., Thyssen, J.H., Der Kinderen,
P.J., Maes, R.A.:
Evaluation of the manual enzyme immuno-
assay (EMIT) procedure for determination
of serum thyroxine.
J.Clin.Chem.Clin.Biochem. 17, 315-20
(1979)
31. Riesen, W.F., Muacevic, B., Jaggi, M.:
Radioimmunoassay and automated enzyme
immunoassay for the determination of
thyroxine.
J.Clin.Chem.Clin.Biochem. 16, 387-9
(1978)
32. Rubenstein, K.E., Schneider, R.S., Ullman, E.:
Homogeneous enzyme immunoassay.
A new immunochemical technique.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 47, 846
(1972)
33. Schuur, A.H.W.M., van Weemen, B.K.:
Enzyme-immunoassay
Clin.Chem.Acta 81, 1-40 (1977)
34. Tsuji, A., Maeda, M., Arakawa, H., Matsuoka, K., Kato, N.,
Naruse, H., Irie, M.:
Enzyme immunoassay of hormones and
drugs by using fluorescence and chemi-
luminescence reactions. pp.327-39.
PAL SB, ED. Enzyme labelled immunoassay
of hormones and drugs.
Berlin, de Gruyter (1978)

35. Ullman, E.F., Blakemore, J., Leute, R.U., Eimstad, W., Jaklitsch, A.P.:
Homogeneous enzyme immunoassay for thyroxine.
Clin.Chem. 21, 1011 (1975)
36. Van Lente, F., Galen, R.S.:
Determination of thyroxine by enzyme immunoassay on the AGA autochemist and ABA-100-Analyzer.
pp. 341-57.
PAL SB, ED. Enzyme labelled immunoassay of hormones and drugs.
Berlin, de Gruyter (1978)
37. Vogt, W.:
Enzymimmunoassay-Radioimmunoassay, Alternative oder Ergänzung.
S. 42-51.
W.Vogt: Enzymimmunoassay, Stuttgart (1978)
38. Vogt, W., Braun, S.:
Adaptions of enzyme immunoassay for thyroxine.
Clin.Chem. 26, 1372-3 (1980)
39. Williams, D.G.:
in: Enzyme-labelled immunoassay of hormones and drugs.
Herausg. S.B. Pal, Proc. of the international symposium on enzyme-labelled immunoassay of hormones and drugs, Ulm, West Germany, Walter de Gruyter, Berlin (1978) 129
40. Woodrup, P., Willing, G., Watson, D.:
Enzyme Immunoassay of thyroxine with Cobas Bio centrifugal analyzer.
Am.Clin.Biochem. 17, 159-60 (1980)
41. Yalow, R.S., Berson, S.A.:
in: Nature 184, 1648-49 (1959)
42. Zaborsky, O.R., Ogletree, J.:
The immobilization of glucose oxidase via activation of its carbohydrate residues.
Biochem.Biophys.Res.Com. 61, 210-16 (1974)

Lebenslauf

Am 19.3.1959 wurde ich als Tochter des Kaufmanns Erich Röhler und seiner Frau Erika geb. Kosciankowski in Butzbach/Hessen geboren.

Von 1965 bis 1968 besuchte ich die Volksschule an der Wilhelmskirche in Bad Nauheim, danach trat ich in das Ernst-Ludwig-Gymnasium in Bad Nauheim ein, wo ich 1977 mein Abitur bestand.

Im Wintersemester 1977/78 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München mit dem Medizinstudium. Im Sommer 1979 legte ich die Ärztliche Vorprüfung ab, 1980 den 1. Teil und 1983 den 2. Teil der Ärztlichen Prüfung.

Mit den Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit begann ich im April 1980 unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr.med. K. Horn und Frau Dr.med. C. Bernutz in der Endokrinologischen Abteilung (Leitung: Frau Prof.Dr.med. C.R. Pickardt) an der Medizinischen Klinik Innenstadt der Universität München.

